

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. März 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/18634 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/09864

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. August 2001 (27.08.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 41 809.0 25. August 2000 (25.08.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): GIESING, Michael [DE/DE]; Berghäuser
Strasse 295, 45659 Recklinghausen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GRILL, Hans-Jörg
[DE/DE]; Stenkhoffstr. 13, 45659 Recklinghausen
(DE). PRIX, Lothar [DE/DE]; König-Ludwig-Strasse
107a, 45663 Recklinghausen (DE). SCHÜTZ, Andreas
[DE/DE]; Lohhäuser Strasse 2a, 45739 Oer-Erkenschwick
(DE).

(74) Anwälte: REITSTÖTTER, KINZEBACH & PART-
NER usw.; Sternwartstrasse 4, 81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ARRAYS OF IMMOBILISED BIOMOLECULES, PRODUCTION AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: ARRAYS IMMOBILISierter BIOMOLEKÜLE, DEREN HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to arrays of immobilised biomolecules, coupled by means of coupling groups, preferably quinone, to a carbonaceous support surface. The carbonaceous surface comprises at least one polymer based on cycloolefins, or may be obtained whereby a glass, metal or ceramic surface is treated with an aqueous solution of at least one carbon-containing compound which may be hydrolysed and the surface subjected to thermal treatment. Anthraquinone and polycycloolefin surfaces based on norbornene are preferably used, or surfaces silanised with hydrophobic residues according to the sol-gel technique. The advantages of said arrays lie above all in the quality thereof, in particular with relation to the homogeneity and reproducibility with which the biomolecules are immobilised. The invention further relates to methods for the immobilisation of biomolecules and the use of the arrays for diagnostic purposes.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Arrays immobilisierter Biomoleküle, die über Kopplungsgruppen, vorzugsweise Chinone, an eine kohlenstoffhaltige Trägeroberfläche gekoppelt sind. Die kohlenstoffhaltige Oberfläche enthält wenigstens ein Polymer auf Cycloolefin-Basis oder ist dadurch erhältlich, dass man eine Glas-, Metall- oder Keramikoberfläche mit einer wässrigen Lösung wenigstens einer hydrolysierbaren kohlenstoffhaltigen Verbindung behandelt und die Oberfläche thermisch behandelt. Vorzugsweise verwendet man Anthrachinone, Polycycloolefin-Oberflächen auf Norbornen-Basis bzw. in Anlehnung an die Sol-Gel-Technologie mit hydrophoben Resten silanisierte Oberflächen. Die Vorteile erfindungsgemässer Arrays liegen vor allem in der Qualität insbesondere in Bezug auf die Homogenität und Reproduzierbarkeit, mit der die Biomoleküle sind. Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen und die Verwendung der Arrays für diagnostische Zwecke.

WO 02/18634 A2

Arrays immobilisierter Biomoleküle, deren Herstellung und Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft Arrays immobilisierter Biomoleküle auf kohlenstoffhaltigen Oberflächen, deren Herstellung und Verwendung. Ebenfalls betrifft die vorliegende
5 Erfindung Vorrichtungen auf Basis der Arrays, insbesondere Chips und Dipsticks sowie Träger mit strukturierter Oberfläche zur gezielten Immobilisierung von Biomolekülen.

Mit der zunehmenden praktischen Bedeutung der molekularbiologischen Analytik stoßen die mit einem sehr hohen Arbeits- und Kostenaufwand verknüpften, oft Tage oder
10 Wochen dauernden etablierten Standardtechniken an Grenzen. Neue Testformate wie Biochips sollen eine enorme Zeit und Kostenersparnis ermöglichen. Da mit dieser Technik sehr viele verschiedene auf engstem Raum immobilisierte Substanzen gleichzeitig mit einer einzigen zu analysierenden Probe in Kontakt gebracht werden können, ist der pro Messung aus einem Chip gewonnene Informationsgehalt sehr hoch.

15 Eine Übersicht über die bekanntesten Biochip-Systeme wird von Bowtell D. D. L. nature genetics supplement 21 (1999) 25-32 gegeben.

Ein typisches Beispiel eines sogenannten „high density array“ ist der GeneChip von
20 Affymetrix, ein Oligonukleotidarray mit typischerweise über 400 verschiedenen Capture Probes, die Base für Base auf dem Glaswafer aufgebaut werden. Die Chips zeichnen sich durch eine sehr hohe Informationsdichte von bis zu 40.000 Oligonukleotiden/cm² aus. Die einzelnen "Spots" sind rechteckig. Die Spotflächen sind allerdings nicht homogen und vor allem an den Rändern ist oft eine schlechte Hybridisierung zu beobachten (vgl auch US
25 5,744,305; US 5,800,922; US 5,445,934; US 5,795,716).

„Low Density Arrays“ sind beispielsweise von Genometrix erhältlich. Maximal 250 Spots von 50 µm Durchmesser werden mit einem Kapillar-Pin-Bündel aus bis zu 1000 Einzelkapillaren in die Kavitäten einer 96-er Mikrotiterplatte gedruckt. Zur Ankopplung an die
30 Oberfläche werden konventionelle Techniken verwendet, denen insbesondere Aminosilanisierungen und NHS-aktivierte Haptene, epoxyaktivierte Oberflächen, Carbodiimidkoppelungen an Carboxylgruppen sowie Biotin/Streptavidin-Bindungen zugrunde liegen (vgl. WO 97/18226; EP 0910570 A1; WO 98/29736).

35 Die Qualität dieser Biochips reicht für einen zufriedenstellenden Einsatz insbesondere in der medizinischen Diagnostik allerdings nicht aus. Dies hat verschiedene Gründe.

Beispielsweise werfen die üblicherweise verwendeten Trägermaterialien Probleme auf. Glasoberflächen erfordern zunächst Silanisierungen. Dazu werden Lösungen von Silanen in aprotischen Lösungsmitteln auf die Glasoberflächen aufgetragen. Die auf der Oberfläche vorhandenen OH-Gruppen hydrolysieren die Silane, welche dann unter Ausbildung eines Netzwerks kondensieren(vgl. DE 197 22 374 C2; DE 38 79 612 T2). Derartige Beschichtungen sind im allgemeinen sehr inhomogen und wenig reproduzierbar und hängen darüber hinaus stark von der Vorbehandlung der Glasoberfläche ab. Nachteilig an Membranen oder Gelen sind die häufig auftretenden Diffusionsprobleme und vor allem bei Nylon-Membranen eine hohe Hintergrundfluoreszenz.

10

Für Kunststoffe fehlen meist koppelbare funktionelle Gruppen. Lediglich Polystyrol hat eine gewisse Bedeutung für die Adsorption von Proteinen. Deshalb wurde auch bereits versucht, Polymeroberflächen zwecks Einführung funktioneller Gruppen zu modifizieren. Beispielsweise nennt die EP 0 319 957 A2 verschiedene, an sich bekannte photoreaktive Gruppen, mit denen sich olefinische Polymer-Oberflächen modifizieren lassen. Demgegenüber werden Chinone als photoreaktive Gruppen gemäß der WO 96/31557 bevorzugt. Daß derartige Chinone allerdings nicht nur mit der Polymer-Oberfläche, sondern auch mit anhängenden funktionellen Gruppen reagieren können, zeigt die Lehre der US-A-5, 292,873, wonach Chinon-Derivate zur Quervernetzung mit Oligonukleotiden reagieren.

20 Für die Immobilisierung von Biomolekülen über derartige Chinone bedeutet dies eine mögliche, das Ergebnis beeinträchtigende Nebenreaktion.

25

Auch der Kopplungsvorgang von Biomolekülen an die Oberfläche ist kritisch. Werden die Biomoleküle strukturiert aufgebracht, hat die Verdunstung der winzigen Flüssigkeitsmengen einen starken Einfluß auf die Spotqualität. Durch den Trocknungsprozeß kommt es zu starken Konzentrationsunterschieden innerhalb eines Spots. Die sehr kurzen Reaktionszeiten von oft nur wenigen Sekunden reichen meist nicht für eine vollständige homogene Absättigung der Oberfläche mit Biomolekülen aus. Die Inhomogenitäten der Spots und die mangelnde Ausrichtung der Biomoleküle führt in fast allen Fällen zu hohen Variationskoeffizienten und einem niedrigen dynamischen Meßbereich.

30

Eine unabhängige Kontrolle der Biochip-Qualität oder ein Vergleich verschiedener Systeme wäre wünschenswert. Zwar sind in der Regel verschiedene Kontrollspots in die meisten erhältlichen Arrays integriert. Diese erlauben aber lediglich eine Aussage darüber, ob Probenvorbereitung und Inkubation erfolgreich waren und ob alle nötigen Reagenzien zugesetzt wurden. Eine Bewertung der Ergebnisse und eine Plausibili-

35

tätsprüfung wird dem Benutzer überlassen. Einheitliche Standards über Qualitätsmerkmale von Biochip-Arrays fehlen.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher das technische Problem zugrunde, qualitativ
5 hochwertige Biochips mit homogen und reproduzierbar aufgetragenen Biomolekülen zur Verfügung zu stellen.

Zur Lösung dieses Problems schlägt die Erfindung vor, die Biomoleküle an eine kohlenstoffhaltige Oberfläche zu koppeln, die entweder auf Polycycloolefinen basiert oder durch
10 ein bestimmtes Hydrophobisierungs-Verfahren erhältlich ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Arrays immobilisierter Biomoleküle, die an eine kohlenstoffhaltige Trägoberfläche gekoppelt sind, wobei die Arrays dadurch gekennzeichnet sind, daß die kohlenstoffhaltige Oberfläche

15 a) wenigstens ein Polymer auf Cycloolefin-Basis enthält; oder
b) erhältlich ist dadurch, daß man eine Glas- oder Metalloberfläche mit einer wässrigen Lösung wenigstens einer hydrolysierbaren kohlenstoffhaltigen Verbindung behandelt und die Oberfläche erwärmt.

20 Mit der Erfindung sind zahlreiche Vorteile verbunden:

Die erzeugten Arrays sind sehr robust und besitzen gute Lagereigenschaften. Die Arrays lassen sich verkapseln und/oder in automatische Analysengeräte integrieren. Als Spot immobilisierte Biomoleküle weisen eine gleichmäßige Beschichtung auf, d.h. sie sind
homogen, insbesondere werden „Kaffeeleckformen“ vermieden. Für Oligonukleotidarrays
25 werden gute Diskriminierungsraten erzielt und ein hoher dynamischer Bereich für Hybridisierungsexperimente von $>10^4$ zur Verfügung gestellt. Intra- und Interarray-Variationen sind gering. So kann eine Intraassay-Varianz von weniger als 7% und eine Interassay-Varianz von weniger als 12% erzielt werden. Damit wird der Einsatz der Arrays im diagnostisch/analytischen Bereich ermöglicht.

30

Der Begriff „Array“ bezeichnet eine Anordnung definierter Plätze, insbesondere eine örtliche Zuordnung bestimmter Substanzen zu definierten Plätzen, wobei verschiedenen Plätzen gleiche oder unterschiedliche Substanzen zugeordnet sein können. Ein definierter Platz entspricht einer bestimmten Fläche, deren Wert einer Intraassay-Varianz von
35 vorteilhafterweise weniger als 15%, vorzugsweise von weniger als 7% bzw. einer Interassay-Varianz von vorteilhafterweise weniger als 20%, vorzugsweise von weniger als 15% und insbesondere von weniger als 10% unterliegt, wenn man zwei Flächen miteinander

vergleicht. Einem Platz ist in der Regel eine Substanzart zugeordnet, wobei allerdings auch denkbar ist, Gemische aus zwei oder mehreren Substanzarten einem Platz zuzuordnen. Bevorzugt sind zweidimensionale Arrays. Die Plätze bilden zweckmäßigerweise ein regelmäßiges zweidimensionales Muster von Feldern. Innerhalb eines Arrays können
5 jeder Substanzart bzw. jeder Art von Substanzgemisch ein Feld oder mehrere Felder zugeordnet werden.

Der Begriff „Biochip“ bezeichnet einen Array von Biomolekülen, die auf einem festen Träger kovalent, adsorptiv oder über andere physikalisch/chemische Wechselwirkungen
10 immobilisiert sind.

Der Begriff „Biomoleküle“ bezeichnet beliebige biochemische und biologische Substanzen, sowohl als einzelne Moleküle als auch als mehrere miteinander wechselwirkende Moleküle. Zu nennen sind beispielsweise:

- 15 • Nukleinsäuren, insbesondere Oligonukleinsäuren, z.B. einzel- und/oder doppelsträngige, lineare, verzweigte oder circuläre DNA, cDNA, RNA, PNA (Peptide Nucleic Acid), LNA (Locked Nucleic Acid), PSNA (Phosphothioate Nucleic Acid);
- Antikörper, insbesondere humane, tierische, polyklonale, monoklonale, rekombinante, Antikörperfragmente, z.B. Fab, Fab', F(ab)₂, synthetische;
- 20 • Proteine, z.B. Allergene, Inhibitoren, Rezeptoren;
- Enzyme, z.B. Peroxidasen, Alkalische-Phosphatasen, Glukose-Oxidase, Nukleasen;
- kleine Moleküle (Haptene), z.B. Pestizide, Hormone, Antibiotika, Pharmaka, Farbstoffe, synthetische Rezeptoren, Rezeptorliganden.

25 Einem weiteren Aspekt zufolge definiert der Begriff „Biomolekül“ die Fähigkeit einer Substanz, mit einer biologischen Probe bzw. einem Teil davon, insbesondere dem Analyt, in eine bestimmte analytische Wechselwirkung treten zu können.

Einem besonderen Aspekt zufolge ist ein bestimmter Typ von Biomolekül als Ligand zu
30 bezeichnen. Liganden wechselwirken mit und insbesondere binden sie - vorzugsweise spezifisch - an bestimmte Targets.

Zur Immobilisierung werden die Biomoleküle an eine Trägeroberfläche gekoppelt. Dies kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen. Prinzipiell können die Oberflächen in
35 geeigneter Weise funktionalisiert werden, z.B. mit Epoxiden, NHS-Estern oder Aldehyden zur Ankopplung von aminomodifizierten Biomolekülen. Eine erfindungsgemäß bevorzugte Möglichkeit besteht darin, die Kopplung über bestimmte Gruppen zu realisieren (Kopp-

lungsguppen), die mit nicht funktionalisierten und insbesondere den nachfolgend näher beschriebenen kohlenstoffhaltigen Oberflächen reaktiv sind. Besonders bevorzugt sind in diesem Zusammenhang Gruppen, die mit Kohlenwasserstoffresten eine Bindung ausbilden können. Hier sind insbesondere durch Strahlung aktivierbare Strukturen zu nennen, wie Coumarine, Benzofurane, Indole, Anglecine, Psoralene, Gruppen, die Carbene, Nitrene oder angeregte Ketone erzeugen können, z.B. Azide, Diazoverbindungen, Diazirine, Ketone wie Diphenylketone, Benzophenone und Acetophenone, und Peroxide (vgl. auch die in EP 0 319 957 A2 offenbarten Verbindungen der Formel I, welche über die Bezugnahme Teil der vorliegenden Offenbarung sind).

10

Gemäß einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform erfolgt die Kopplung über Chinone. Anhand dieser Ausführungsform werden nun stellvertretend für weitere brauchbare Kopplungsgruppen besondere Ausgestaltungen erfindungsgemäßer Arrays beschrieben.

15

Chinone sind in der Regel photochemisch reaktiv und lassen sich mittels geeigneter Strahlung an kohlenstoffhaltige Materialien koppeln. Die Kopplung erfolgt in der Regel über kovalente Bindungen.

20 Der Begriff "Chinon" beschreibt erfindungsgemäß Verbindungen, die wenigstens 2 konjugierte Carbonylgruppen als Teil wenigstens einer cyclischen Kohlenwasserstoffstruktur aufweisen. Die Bedeutung des Begriffs "Chinon" ist allgemein geläufig. Zu den Chinonen zählen beispielsweise Anthrachinone, Phenanthrenchinone, Benzochinone, Naphthochinone und weitere Chinone, von denen einige Vertreter, die durch Bezugnahme
25 Teil dieser Anmeldung sind, in der Figur 1 der WO 96/31557 gezeigt sind. Diese Chinone können wie auch die zuvor genannten Kopplungsgruppen substituiert sein. Eine Aufzählung brauchbarer Substituenten, die durch Bezugnahme Teil dieser Anmeldung sind, findet sich auf den Seiten 11 und 12 der WO 96/31557. Bevorzugt sind Anthrachinone.

30 Chinon und Biomolekül sind miteinander verknüpft. Prinzipiell kann diese Verknüpfung auf beliebigem physikalisch-chemischen Weg, insbesondere kovalenten und adsorptiven, Wechselwirkungen beruhen und direkt oder indirekt, beispielsweise über Spacer oder weitere zumindest bifunktionelle Linker erfolgen. So werden zweckmäßigerweise Chinon-
35 derivate verwendet, die wenigstens einfach substituiert sind. Vorteilhaft sind beispielsweise Chinoncarbonsäurederivate, die insbesondere über Ester- und vorzugsweise Amidbindungen an das Biomolekül oder gegebenenfalls an einen Spacer oder anderen Linker gebunden sind. In entsprechender Weise ist ein Fachmann in der Lage, Chinone mit

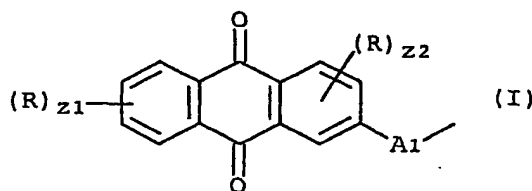
anderen funktionellen Gruppen zu versehen, die Bindungen ausbilden können, welche unter den Herstellungs- und Anwendungsbedingungen der Arrays stabil sind. Ether-, Amin-, Sulfid- und Disulfidbindungen seien hier beispielhaft genannt.

- 5 Darüber hinaus können die Chinone einen oder mehrere weitere Substituenten tragen. So vermag man Polarität und damit insbesondere Löslichkeit und Affinität der Chinone zu beeinflussen und vorteilhafterweise an bestimmte Modalitäten wie das Aufbringen der Chinone auf die Trägeroberfläche bzw. an das Oberflächenmaterial anzupassen.
- 10 Der Begriff „Chinonderivat“ wird im folgenden für Substanzen verwendet, die wenigstens eine Chinon-Struktur aufweisen. Hierzu zählen z.B. funktionalisierte Chinone, Verknüpfungen von Chinonen mit Spacern, Linkern und/oder Biomolekülen bzw. modifizierte Varianten davon, also beispielsweise aktivierte, geschützte oder in sonstiger Weise zu synthetischen Zwecken hergerichtete Derivate.
- 15 Gemäß einer Ausführungsform sind Chinone direkt an Biomoleküle geknüpft. Diese Anordnung erfindungsgemäßer Chinonderivate wird im folgenden mit "Q-B" abgekürzt und findet vor allem Anwendung bei Biomolekülen mit relativ hohem Molekulargewicht, wie Antikörpern, Proteinen und Enzymen.
- 20 Gemäß einer weiteren Ausführungsform sind Chinone über Spacer an Biomoleküle geknüpft. Diese Anordnung erfindungsgemäßer Chinonderivate wird im folgenden mit "Q-S-B" bezeichnet und findet vor allem Anwendung bei Biomolekülen mit relativ niedrigem Molekulargewicht, wie Nukleinsäuren, insbesondere Oligonukleinsäuren und Haptenen.
- 25 Der Begriff "Spacer" bezeichnet multi- und insbesondere bifunktionelle Linker bestimmter Länge, die im vorliegenden Fall in der Regel an Chinon einerseits und Biomolekül andererseits geknüpft sind. Prinzipiell können Spacer homo- oder hetero(bi)funktional sein, wobei eine Hetero(bi)funktionalität eine Variation der an sich durch ein bestimmtes
- 30 Chinonderivat vorgegebenen Funktionalität ermöglicht. So können Chinon und Biomolekül durch die Wahl zweckmäßiger heterobifunktioneller Spacer optimal miteinander verknüpft werden, um einerseits der vom Chinonderivat vorgegebenen Bindungsart zu entsprechen und andererseits eine Funktionalität zur Verfügung zu stellen, die eine effektive, aber auch insbesondere bei Proteinen möglichst schonende Verknüpfung ermöglicht. Handelt
- 35 es sich bei dem Biomolekül um einen Liganden, kann über Art und insbesondere Länge des Spacers die Wechselwirkung von Biomolekül und Target beeinflusst werden. Vor allem

läßt sich die Akzessibilität immobilisierter Biomoleküle für die Wechselwirkung mit dem Target optimieren.

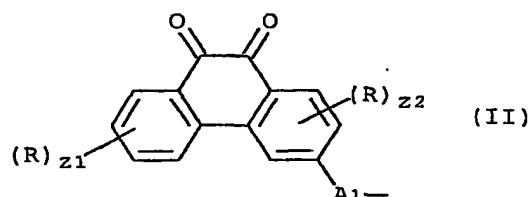
Bevorzugte Chinonderivate sind Anthrachinon-2-yl-derivate der Formel I

5



10 Phenanthrenchinon-3-yl-derivate der Formel II

15



wobei in den Formeln I und II die Reste R gleich oder verschieden sein können und unabhängig voneinander für die oben genannten brauchbaren Substituenten und bevorzugt für C₁-C₄-Alkyl, C₃-C₁₀-Cycloalkyl, C₆-C₁₀-Aryl oder C₇-C₁₂-Aralkyl stehen können, z₁ und z₂ unabhängig voneinander für einen Wert von 0, 1, 2, 3 oder 4 stehen und A₁ für CO, CH₂, CS, O oder S steht. Vorzugsweise stehen z₁, z₂ für Null und steht A₁ für CO oder CH₂. Besonders bevorzugt sind Anthrachinon-2-carbonsäure-Derivate. Als immobilisierte Biomoleküle sind diese Chinonderivate, gegebenenfalls über Spacer und/oder weitere Linker, an wenigstens ein Biomolekül geknüpft.

Als Spacer eignen sich beispielsweise homobifunktionelle Verbindungen, wie Diamine, Disäuren, z.B. Dicarbonsäuren, oder Ethylenglycol-Oligomere, bzw. heterobifunktionelle Verbindungen, wie Aminosäuren, z.B. β-Alanin, Glycin, 6-Aminocaprinsäure oder -Aminobuttersäure, Arylacetylene, Biotine, Avidine, Streptavidine, Oligosaccharide, z.B. aus Ribosen oder Desoxyribosen, Nukleinsäuren, vor allem oligo-(d)A oder -(d)T, Fettsäuren, Phosphorsäureester sowie Derivate und/oder Kombinationen davon.

Spacer können auch aus mehreren Teilen (Linkern) aufgebaut sein, die miteinander durch kovalente und/oder nichtkovalente Bindungen verknüpft sind. Beispiele für kovalent verknüpfbare Teile eines Spacers sind heterobifunktionelle Elemente, wie Aminosäuren, beispielsweise 6-Aminocaprinsäure oder γ-Aminobuttersäure, von denen mehrere zur

- Verlängerung eines Spacers miteinander verbunden werden können. Beispiele für nichtkovalent verknüpfbare Teile eines Spacers sind Moleküle, zwischen denen sich Affinitätsbindungen ausbilden können, wie zwischen Biotin und Avidin bzw. Streptavidin oder deren Analoga. Biotin/Avidin-Spacer, Avidin/Biotin/Avidin-Spacer, anti-Biotin-Antikörper/Biotin/Avidin-Spacer oder Dig/anti-Dig-Spacer sind bevorzugte Spacer dieses Aspekts.

- Spacer können eine oder auch mehrere Bindungsstellen für Biomoleküle aufweisen (z.B. Dendrimere). Die vorstehend genannten heterobifunktionellen Elemente beispielsweise weisen in der Regel eine, zwei oder drei derartige Bindungsstelle auf, während Affinitätsbindungen ausbildende Moleküle, wie Avidin oder Streptavidin, mehrere Bindungsstellen aufweisen. Letzteres kann zu einer vorteilhaften Erhöhung immobilisierter Biomoleküle pro Flächeneinheit führen.

- Spacer können auch variable Bindungsstellen aufweisen, die in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Konfiguration unterschiedliche Bindungsmöglichkeiten bieten. Dies gilt insbesondere für Affinitätsbindungen, deren Bindungsaffinität je nach Konfiguration der beteiligten Bindungspartner variieren kann.

- Bevorzugte Spacer basieren auf Diaminen der Formel III



- Aminosäuren der Formel IV

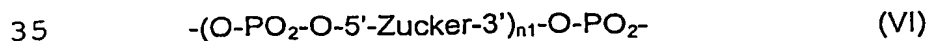


Polyethylenglykolen der Formel V

30

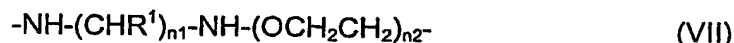


Oligo-Zuckerphosphaten der Formel VI



35

oder Kombinationen davon, insbesondere



- wobei in den Formeln III bis VII n_1 einem Wert von 1 bis 50 und insbesondere von 5 - 20 entspricht und n_2 einem Wert von 2 bis 100 und vorzugsweise 5 bis 50 entspricht, R^1 die für R angegebenen Bedeutungen besitzt, wobei mehrere Reste R^1 gleich oder verschieden sein können (bei $n_1 \neq 1$) und der Zucker insbesondere Ribose und Desoxyribose, vorzugsweise in der D-Form, ist. In der Kombination entspricht n_1 insbesondere einem Wert von 2 bis 6 und bevorzugt von 3 während n_2 insbesondere einem Wert von 2 bis 20, bevorzugt 4 bis 10, z.B. 6, entspricht. Vorzugsweise steht R^1 für α -C-Substituenten natürlich vorkommender Aminosäuren, insbesondere für Wasserstoff und C_1 - C_4 -Alkyl. Die Verknüpfung zum Chinon kann prinzipiell an beiden Bindungsstellen erfolgen (Q-S- bzw. -S-Q), bevorzugt sind gemäß obiger Darstellung Q-S-Derivate.
- Für die Bindung von Chinonen bzw. Spacern an Biomoleküle gelten im Prinzip obige Ausführungen zur Bindung von Chinonen an Spacer entsprechend. Kovalente Bindungen, insbesondere -O-, -NH- oder -S-, werden bevorzugt.

- Biomoleküle können dazu bestimmte Funktionalitäten vorgeben, sie können aber auch zweckmäßig modifiziert werden. Beispielsweise können Proteine über Amino-, Sulfid oder Carboxygruppen, und Nukleinsäuren über 5'- oder 3'-OH-Gruppen binden. Proteine können beispielsweise in an sich bekannter Weise reduktiv modifiziert werden, um Disulfidbrücken in freie Sulfidgruppen zu überführen, und Nukleinsäuren können beispielsweise mit bekannten und auch kommerziell erhältlichen Reagenzien umgesetzt werden, um terminale OH-Gruppen in Aminogruppen aufweisende Gruppen zu überführen.

- Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform sind Nukleinsäuren über ihr jeweiliges 5'-Ende an Chinon oder Spacer gebunden. Vorteilhafterweise kann dies über Polyethylenglykol-Spacer erfolgen, insbesondere den Spacern der Formel VII.

- Neben immobilisierten Biomolekülen können weitere Substanzen auf der kohlenstoffhaltigen Oberflächen immobilisiert sein, die kein Biomolekül im erfindungsgemäßen Sinn beinhalten. Diese können an eigenen Plätzen des Arrays oder zusammen mit Biomolekülen in statistischer Verteilung an einem Platz immobilisiert sein (co-immobilisiert). Zweckmäßigerweise sind derartige Moleküle ebenfalls über Chinone an die Trägeroberfläche gekoppelt. Prinzipiell brauchbar sind daher Chinone und Chinonderivate, die sich

von den jeweiligen immobilisierten Biomolekülen ableiten, selbst aber kein Biomolekül im erfindungsgemäßen Sinn beinhalten. Hierzu gehören insbesondere Chinonderivate, insbesondere funktionalisierte Chinone (Q), die gegebenenfalls mit Spacern (Q-S) und/oder weiteren Gruppen verknüpft sind. Geeignete weitere Gruppen (B') können sich insbesondere von immobilisierten Biomolekülen ableiten, z.B. Analoga oder Teile eines Biomoleküls, die mit einer biologischen Probe, insbesondere einem Analyt, nicht in die analytische Wechselwirkung zu treten vermögen, zu der das entsprechende Biomolekül in der Lage ist. Beispielsweise kann der Teil eines Biomoleküls ein Nukleotid, Dinukleotid oder Trinukleotid sein, daß nicht mit den in der biologischen Probe vorhandenen Nukleinsäuren zu hybridisieren vermag, während das Biomolekül ein Oligonukleotid ist, das dazu in der Lage ist.

Prinzipiell können auf einen Array pro cm^2 Trägeroberfläche mehr als 60, 100, 600, 1000, 5000, 10000, 40000, 100000, 400000 oder 1000000 definierte Plätze angeordnet sein. In der Regel weisen erfindungsgemäße Arrays 5 — 10000 Plätze/ mm^2 auf. Eine besondere Ausführungsform sind Arrays mit 5 – 100 Plätzen/ mm^2 und insbesondere 10 bis 50 Plätzen/ mm^2 (low density). Eine weitere besondere Ausführungsform sind Arrays mit 100 – 10000 Plätzen/ mm^2 und insbesondere 500 – 2500 Plätzen/ mm^2 (high density). An verschiedenen Plätzen können gleiche oder verschiedene Chinonderivate, mitunter verschiedene Biomoleküle immobilisiert sein.

Zweck der vorstehend beschriebenen Anordnung unter Verwendung co-immobilisierter Chinonderivate ist es, Plätze mit definierten Dichten immobilisierter Biomoleküle bereitzustellen. Erfindungsgemäß werden auf diese Art Dichten realisiert, die kleiner sind, als der Wert, der einer maximalen Belegung immobilisierbarer Moleküle pro Flächeneinheit entspricht. So können erfindungsgemäße Anordnungen bei insgesamt x an eine Oberflächeneinheit gekoppelten Chinonen bzw. Chinonderivaten (x-y) immobilisierte Biomoleküle aufweisen, wobei y die Anzahl co-immobilisierter Chinonderivate ist. Vorzugsweise entspricht der Wert x der maximalen Anzahl an eine Oberflächeneinheit koppelbarer Chinone (Sättigungsgrad), d.h. bevorzugte Arrays weisen Felder immobilisierter Biomoleküle auf, deren Oberfläche in Bezug auf die Kopplung der verwendeten Chinonderivate gesättigt ist. Der Anteil immobilisierter Biomoleküle $(x-y/x)$ beträgt vorteilhafterweise wenigstens 0,001, vorzugsweise wenigstens 0,1. und insbesondere wenigstens 0,75. In bestimmten Fällen kann der Anteil vorteilhafterweise weniger als 1, vorzugsweise weniger als 0,75 und insbesondere weniger als 0,5 betragen.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform beinhalten erfindungsgemäße Arrays wenigstens 2 Plätze mit in unterschiedlichen Dichten immobilisierten Biomolekülen der gleichen Art. In Form von Standardreihen kann so eine interne Kalibrierung ermöglicht werden.

5

Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform beinhaltet ein Platz immobilisierter Biomoleküle eine Markierung, die zur Menge gekoppelter Chinonderivate proportional ist. Zweck dieser Ausgestaltung ist es, eine Beurteilung der immobilisierten Biomoleküle insbesondere im Hinblick auf die Menge und Verteilung der immobilisierten Biomoleküle vornehmen zu können.

10

Dazu können immobilisierte Biomoleküle und/oder co-immobilisierte Chinonderivate markiert sein. Vorzugsweise sind die Spacer markiert.

15

Grundsätzlich sind alle Markierungsarten geeignet. Vorzugsweise wird die Markierung so gewählt, daß sie nicht oder nur minimal mit der nachfolgenden Analytik interferiert, die Verwendung der Arrays also nicht oder nur unwesentlich beeinflußt. Dazu sind vor allem gegebenenfalls erforderliche Markierungen der Probe, also insbesondere von Nukleinsäure-Targets zu beachten. Andererseits kann die Markierung so gewählt werden, daß sie mit der Markierung der Probe wechselwirkt. Das von wechselwirkenden Markierungen ausgehende Signal kann unterscheidbar sein von demjenigen, das von den entsprechenden nicht wechselwirkenden Markierungen ausgeht. Die Wechselwirkung kann beispielsweise die Signalintensität beeinflussen, z.B. verstärken oder quenchen, oder das Signal modifizieren, z.B. die Wellenlänge absorbierten oder emittierten Lichts verändern.

20

25

Erfindungsgemäß geeignet sind Markierungssysteme, die sich z.B. spektroskopisch, photochemisch, biochemisch, immunochemisch, elektrisch, optisch oder chemisch erkennen lassen. Dazu gehören sowohl direkte Markierungssysteme, wie radioaktive Marker (z.B. ^{32}P , ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C), magnetische Marker, Chromophore, beispielsweise UV-, VIS-, oder IR-absorbierende Verbindungen, Fluorophore, chemi- oder biolumineszierende Marker, Übergangsmetalle, die in der Regel chelatgebunden sind, oder Enzyme, z.B. Meerrettich-Peroxidase oder alkalische Phosphatase und die daran gekoppelten Nachweisreaktionen, als auch indirekte Markierungssysteme, beispielsweise Haptene, wie Biotin oder Digoxigenin, die über entsprechende Nachweissysteme erkannt werden können.

30

35

Vorteilhafte Chromophore besitzen eine intensive Farbe, die von den umgebenden Molekülen nur geringfügig absorbiert wird. Farbstoffklassen, wie Chinoline, Triarylmethane, Acridine, Alizarine, Phthaleine, Azoverbindungen, Anthrachinone, Cyanine, Phenazathioniumverbindungen oder Phenazoniumverbindungen, seien hier stellvertretend für
5 das breite Spektrum erfindungsgemäß geeigneter Chromophore genannt.

Fluoreszierende Markierungen werden bevorzugt. Man erhält starke Signale mit wenig Hintergrund, hoher Auflösung und hoher Sensitivität. Erfindungsgemäß von Vorteil ist, daß ein und derselbe Fluorophor je nach Anregung und Detektionsprinzip mehrere
10 unterscheidbare Strahlungen emittieren kann.

Fluorophore können allein oder in Kombination mit einem Quencher (z.B. Molecular Beacons) verwendet werden.

15 Bevorzugte Fluorophore sind beispielsweise Aminomethylcoumarinessigsäure (AMCA, blau), EDANS, BODIPY 493/503; FL; FL Br2; R6G; 530/550; 558/568; TMR 542/574; TR 589/617; 630/650; 650/665, 6-FAM Fluorescein (grün), 6-OREGON green 488, TET, Cy3 (rot), Rhodamine (rot), 6-JOE, HEX, 5-TAMRA, NED, 6-ROX, TEXAS Red7 (rot), Cy5, Cy5.5, LaJolla Blue, Cy7, Alexa Fluor-Carbonsäuren, insbesondere des Typs 647 und
20 532, z.B. als Succinimidylester, und IRD41.

Besonders bevorzugte Fluorophore sind Cy5, 5-Tamra und Cy3 sowie Alexa-Fluor-Carbonsäuren.

25 Obige beispielhafte Aufzählung verdeutlicht, daß eine Vielzahl unterscheidbarer Markierung zur Verfügung steht, so daß ein zweckmäßiges Verhältnis von Markierungen der immobilisierten Moleküle einerseits und, sofern erforderlich, der Probe andererseits realisiert werden kann.

30 Polymere auf Cycloolefin-Basis sind an sich bekannt. Eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften sind zweckmäßig:

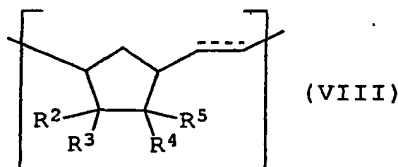
- eine relativ geringe Gesamtoberflächenenergie, die insbesondere niedriger ist als beispielsweise diejenige von Polymethylmethacrylat (PMMA) und vorzugsweise in einem Bereich von 25 bis 35 mN/m und noch bevorzugter in einem Bereich von 28 bis 32
35 mN/m liegt. Hierbei ist vor allem ein relativ geringer polarer Anteil von Vorteil. So beträgt das Verhältnis von dispersivem Anteil zu polarem Anteil nach der OWRK-Methode

vorteilhafterweise wenigstens 2 : 1, vorzugsweise 3 : 1 und besonders bevorzugt wenigstens 4 : 1;

- eine verhältnismäßig geringe Oberflächenrauigkeit. Von Vorteil sind mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) bestimmte rms-Rauigkeiten von weniger als 1,5 nm und vorzugsweise von weniger als 1,0 nm. Vorteilhafterweise liegt die rms-Rauigkeit in einem Bereich von 0,6 bis 0,8 nm;
- eine verhältnismäßig hohe Transmission, vorteilhafterweise wenigstens 85% und vorzugsweise wenigstens 90% Transmissionen bei $\lambda = 400$ nm und/oder $\lambda = 800$ nm (mittels UV-VIS-Spektralphotometrie zu bestimmen);
- eine verhältnismäßig geringe Reflektion, vorteilhafterweise weniger als 10% und vorzugsweise weniger als 9% Reflektion bei $\lambda = 400$ nm und/oder $\lambda = 800$ nm (mittels UV-VIS-Spektralphotometrie zu bestimmen);
- eine verhältnismäßig geringe Wasser-Absorption, die vorteilhafterweise weniger als 0,01 Gew.-% beträgt (ASTM D570);
- einen verhältnismäßig geringen Anteil an Fremdpartikeln. Hierbei ist es von Vorteil, wenn der Gehalt von Fremdpartikeln mit einem Durchmesser von 0,5 μ m oder mehr, weniger als 10^5 Partikel/g und vorzugsweise weniger als 5×10^4 Partikel/g beträgt;
- eine verhältnismäßig geringe Eigenfluoreszenz, die zweckmäßigerweise ähnlich der von Pyrex-Glas ist.

Beispielhaft sei hier auf die in EP 0 591 892, US 5,008,356, US 5,087,677, WO 97/46617, EP 0 713 893, EP 0 827 975, EP 0 997 482 beschriebenen Polycycloolefine (Polymere und Copolymere) Bezug genommen, die Teil dieser Anmeldung sind.

- Bevorzugte Vertreter dieser Gruppe basieren auf Struktureinheiten der Formel VIII



- wobei die Reste R^2 , R^3 , R^4 , R^5 gleich oder verschieden sein können und unabhängig voneinander für Wasserstoff, Halogen, Hydroxy, Cyano, oder - gegebenenfalls einfach, zweifach, dreifach, vierfach oder fünffach mit Halogen, Cyano oder Alkyl - substituiertes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, Cycloalkyl, Cycloalkenyl, Alkoxy, Alkoxy-carbonyl, Alkanoyloxy, Aryl oder Aralkyl stehen, oder R^2 zusammen mit R^3 oder R^4 zusammen mit R^5 für gegebenenfalls in der vorstehend beschriebenen Weise substituiertes Alkyliden stehen, oder 2 oder mehrere der Reste R^2 , R^3 , R^4 , R^5 eine Doppelbindung oder unter entsprechender Modifi-

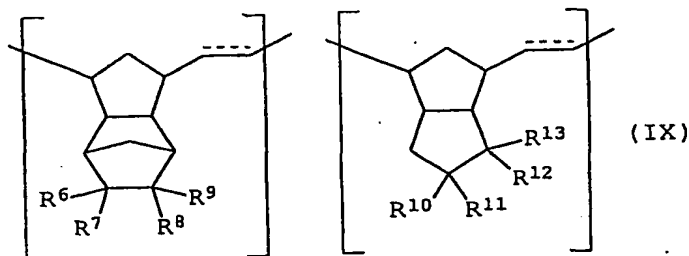
kation der zuvor genannten einbindigen Reste, einen Ring oder mehrere Ringe, insbesondere cycloaliphatische Ringe bilden, die ihrerseits mit einbindigen Resten vom Typ R^2 , R^3 , R^4 , R^5 substituiert sein können. Das Symbol \equiv steht für eine Kohlenstoff-Einfachbindung oder -Doppelbindung.

5

Sofern nichts anderes angegeben ist, steht „Alk“ bzw. „alk“ vor allem für Kohlenwasserstoffreste mit 1 bis 15 Kohlenstoffatomen, und „Aryl“ vor allem für Aromaten mit 6 bis 10 Kohlenwasserstoffresten, insbesondere für Phenyl und Naphthyl.

10 Bevorzugte Polymere dieses Typs basieren auf Struktureinheiten der Formel IX

15

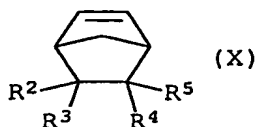


20

wobei R^6 bis R^{13} unabhängig voneinander die oben für R^1 bis R^4 angegebenen Bedeutungen besitzen. Vorzugsweise stehen R^8 bis R^9 unabhängig voneinander für Wasserstoff, C_1 - C_6 -Alkyl oder C_1 - C_6 -Alkyliden, oder 2 oder mehrere der Reste R^6 bis R^9 bilden zusammen einen Cyclohexanring, Cyclopentanring, Norbornenring oder Benzolring. Dies sind auch die bevorzugten Bedeutungen von R^{10} bis R^{13} .

25

Die voranstehend beschriebenen Polymere können als Ringöffnungspolymere oder -copolymere bezeichnet werden. Sie sind erhältlich aus Monomeren der Formel X

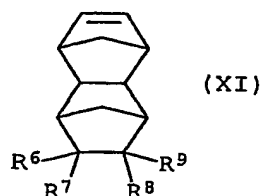


30

wobei R^2 bis R^5 die oben angegebenen Bedeutungen besitzen, und gegebenenfalls weiteren Comonomeren durch Ringöffnungspolymerisation bzw. -copolymerisation und gegebenenfalls anschließender Hydrierung.

Bevorzugte Vertreter dieser Polymere sind erhältlich aus Monomeren der Formel XI

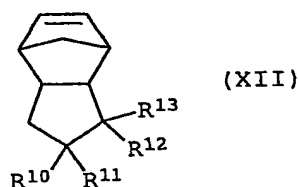
5



wobei R^6 bis R^9 die oben angegebenen Bedeutungen besitzen, und/oder

10 Monomeren der Formel XII

15



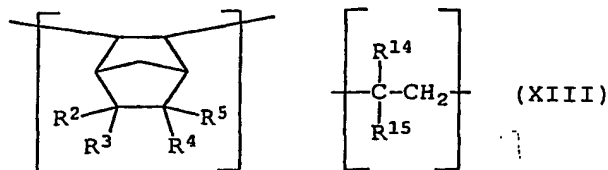
wobei R^{10} bis R^{13} die oben angegebenen Bedeutungen besitzen,

und gegebenenfalls weiteren Comonomeren in entsprechender Weise.

20

Weitere bevorzugte Vertreter von Polymeren auf Cycloolefin-Basis basieren auf Struktureinheiten der Formel XIII

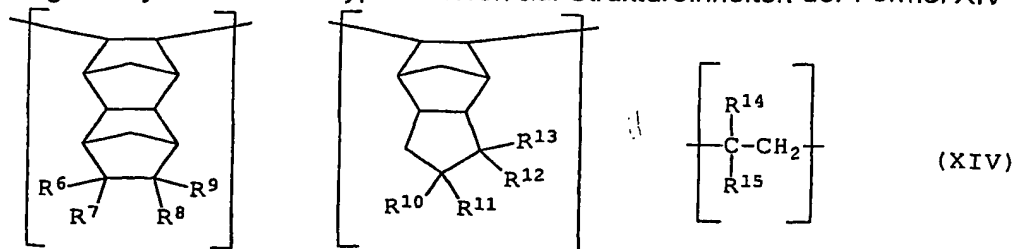
25



wobei R^2 bis R^5 die oben angegebenen Bedeutungen besitzen und R^{14} , R^{15} gleich oder
30 verschieden sein können und unabhängig voneinander für Wasserstoff, Alkyl oder Aryl stehen.

Bevorzugte Polymere dieses Typs basieren auf Struktureinheiten der Formel XIV

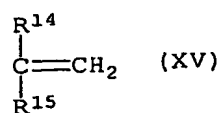
35



wobei R^6 bis R^{13} die oben angegebenen Bedeutungen besitzen. R^{14} , R^{15} stehen vorzugsweise für Wasserstoff, C_1 - C_6 -Alkyl oder C_6 - C_{10} -Aryl, insbesondere für Wasserstoff.

- 5 Diese Polymere können als Additionspolymere oder -copolymere bezeichnet werden. Sie sind erhältlich durch Additionspolymerisation bzw. -copolymerisation wenigstens eines Cycloolefin-Monomers der Formel X, vorzugsweise wenigstens eines Cycloolefinpolymers der Formel XI und/oder wenigstens eines Cycloolefin-Monomers der Formel XII mit einem Monomer der Formel XV

10



wobei R^{14} , R^{15} die oben angegebenen Bedeutungen besitzen,

15

und gegebenenfalls weiterer Comonomere.

Spezifische Beispiele von Monomeren der Formel X sind in der EP 0 827 975 A2 auf den Seiten 6, Zeile 41 bis Seite 8, Zeile 21, in der EP 0 997 482 A1 auf der Seite 4, Zeilen
20 24-49, in der EP 0 713 893 A1 in Spalte 3, Zeile 39 bis Spalte 5, Zeile 2 und in der US 5,008,356 in Spalte 6, Zeile 37-67 und in den Tabellen 1 und 2 genannt. Auf diese Ausführungen wird in vollem Umfang Bezug genommen, womit auch diese Monomere Teil dieser Anmeldung sind.

- 25 Spezifische Beispiele für die Monomere der Formel XV sind in der EP 0 827 975 A2 auf den Seiten 10, Zeile 54 bis Seite 11, Zeile 3, und in der EP 0 997 482 A1 auf der Seite 4, Zeilen 55-58 genannt. Auch auf diese Ausführungen wird in vollem Umfang Bezug genommen, womit auch diese Monomere Teil dieser Anmeldung sind.

- 30 Bevorzugt werden Polycycloolefine, die aus Norbornenderivaten, d.h. insbesondere Norbornen und obigen Angaben entsprechend substituierten Norbornenderivaten, erhältlich sind.

- Eine besondere Ausführungsform erfindungsgemäßer verwendbarer Polymere auf
35 Cycloolefin-Basis sind erhältlich durch Additionspolymerisation von Vinylverbindungen der Formel XV, insbesondere Ethylen, mit

a) Norbornen-Monomeren, insbesondere Norbornen, Tetracyclododecen oder Dicyclopentadien;

b) Monocycloolefin-Monomeren, insbesondere Cyclopenten oder Cyclohexen; oder

c) Cyclische konjugierte Dien-Monomere, insbesondere Cyclopentadien oder Cyclohexadien.

Derartige Additionspolymere sind beispielsweise nach dem in der US 5,087,677 beschriebenen Verfahren erhältlich.

Eine weitere besondere Ausführungsform erfindungsgemäßer verwendbarer Polymere auf Cycloolefin-Basis sind erhältlich durch Ringöffnungspolymerisation von Norbornenderivaten und anschließender Hydrierung der nach Polymerisation verbleibenden Doppelbindungen. Sind die verwendeten Norbornenderivate mit aromatischen Gruppen substituiert oder weisen sie polycyclische Strukturen mit Norbornen- und aromatischen Strukturelementen auf, ist es von Vorteil, wenn wenigstens 90% der ungesättigten Bindungen der Polymerhauptkette hydriert sind während wenigstens 80% der aromatischen Strukturen erhalten sind.

Derartige Ringöffnungspolymere sind beispielsweise nach dem in der EP 0 713 893 A1 beschriebenen Verfahren erhältlich.

Ein Additionspolymer aus Norbornen und Ethylen wird beispielsweise von der Firma Hoechst unter dem Handelsnamen Topas® vertrieben. Weitere im Handel erhältliche Polymere auf Cycloolefin-Basis führen beispielsweise die Handelsnamen Zeonex®, insbesondere Zeonex®480 R und Zeonex®480, und sind von der Firma Zeon erhältlich.

Enthält die Trägeroberfläche wenigstens ein Polymer auf Cycloolefin-Basis, so kann sie zusätzlich weitere Polymere, insbesondere Polyolefine, enthalten. Eine bevorzugte Ausführungsform kohlenstoffhaltiger Oberflächen besteht im wesentlichen aus einem Polymer auf Cycloolefin-Basis oder einem Gemisch mehrerer Polymere auf Cycloolefin-Basis.

Der Träger kann aus einem einheitlichen Material sein. Dies ist insbesondere für Träger mit einer Oberfläche aus Polycycloolefin bevorzugt. Möglich sind allerdings auch Träger, die aus verschiedenen Materialien aufgebaut sind, z.B. bei denen eine erfindungsgemäße

- Oberfläche auf anderen Trägermaterialien aufgebracht ist. Prinzipiell können die erfindungsgemäßen kohlenstoffhaltigen Oberflächen auf beliebige brauchbare Trägermaterialien aufgebracht sein. So können als Trägermaterial beispielsweise folgende Stoffe verwendet werden: Glas (Standardglas, Pyrexglas, Quarzglas), Kunststoffe bevorzugt hoher Reinheit bzw. geringer Eigenfluoreszenz (wie Polyolefine, z.B. PE (Polyethylen), PP (Polypropylen), Polymethylpenten, Polystyrol, PMMA (Poly(methylmethacrylat)), Polycarbonat, Teflon), Metalle (wie Gold, Chrom, Kupfer, Titan, Silizium), oxidische Materialien (Keramiken, aluminiumdotiertes Zinkoxid (TCO), Silica, Aluminiumoxid).
- 5
- 10 Alternativ zu den vorstehend beschriebenen kohlenstoffhaltigen Oberflächen auf Polycycloolefin-Basis können erfindungsgemäße Oberflächen dadurch erhalten werden, daß man Glas-, Metall- oder Keramikoberflächen mit einer wäßrigen Lösung wenigstens einer hydrolysierbaren kohlenstoffhaltigen Verbindung behandelt und die Oberfläche trocknet.
- 15 Zweckmäßige Ausgestaltungen dieser Vorgehensweise richten sich vor allem nach den Vorschriften für Sol-Gel-Prozesse (vgl. z.B. DE 44 08 152 A1; DE 38 87 074 T2; C.J. Brinker, G.W. Scherer, Sol-Gel-Science: *The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, San Diego 1990).
- 20 Geeignete hydrolysierbare kohlenstoffhaltige Verbindungen basieren vor allem auf Elementen M der Hauptgruppen III bis V und der Nebengruppen II bis IV des Periodensystems der Elemente, insbesondere Si, Al, B, Pb, Sn, Ti, Zr, V und Zn, von denen Si, Al, Ti und Zr und insbesondere Si bevorzugt sind. Diese Verbindungen weisen wenigstens eine hydrolysierbare Gruppe A und wenigstens eine nicht hydrolysierbare kohlenstoffhaltige
- 25 Gruppe B auf. In der Regel kann das Molverhältnis von Gruppen A zu Gruppen B in den Verbindungen 10 : 1 bis 1 : 2 betragen.

- Zu hydrolysierbaren Gruppen A gehören Gruppen, die durch Einwirkung von Wasser - gegebenenfalls unter saurer oder basischer Katalyse - abgespalten werden und dadurch
- 30 im Sinne des Sol-Gel-Prozesses Gruppen generieren, die untereinander und mit geeigneten Gruppen auf der Glas-, Metall- oder Keramikoberfläche unter Bindungsbildung (Kondensation) reagieren können. Brauchbare hydrolysierbare Gruppen sind demnach vornehmlich Halogene, insbesondere Cl und Br, Alkoxygruppen, insbesondere C₁₋₄-Alkoxygruppen, Aryloxygruppen, insbesondere C₆₋₁₀-Aryloxygruppen, Acyloxygruppen, insbesondere C₁₋₄-Acyloxygruppen, und Alkylcarbonylgruppen, insbesondere C₁₋₄-Alkylcarbonylgruppen. Bevorzugte Gruppen sind Cl, Methoxy, Ethoxy, n-Propoxy, i-Propoxy, Butoxy, Phenoxy, Acetoxy, Propionyloxy und Acetyl.
- 35

- Wenigstens eine nicht hydrolysierbare kohlenstoffhaltige Gruppen B ist zweckmäßigerweise in der Lage, an Chinone zu koppeln. Derartige Gruppen B leiten sich vor allem von aliphatischen, heteroaliphatischen, cycloaliphatischen, cycloheteroaliphatischen oder
- 5 aromatischen Resten ab. Hierzu gehören vor allem Alkylgruppen, insbesondere C₁-C₃₀-Alkylgruppen, Cycloalkylgruppen, insbesondere C₃-C₁₀-Cycloalkylgruppen, Cycloalkylalkylgruppen, insbesondere C₃-C₁₀-Cycloalkyl-C₁-C₆-alkylgruppen, Alkenylgruppen, insbesondere C₂-C₃₀-Alkenylgruppen, Arylgruppen, insbesondere C₆-C₁₂-Arylgruppen, Aralkylgruppen, insbesondere C₇-C₁₀-Aralkylgruppen, wobei diese Gruppen einfach oder
- 10 mehrfach durch Alkyl, insbesondere C₁-C₄-Alkyl, Alkoxy, insbesondere C₁-C₄-Alkoxy und Halogen substituiert sein können. Bevorzugt sind hydrolysierbare kohlenstoffhaltige Verbindungen mit wenigstens einer aliphatischen oder cycloaliphatischen Gruppe B mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise 3 bis 16 Kohlenstoffatomen.
- 15 Eine besonders bevorzugte Klasse von hydrolysierbaren kohlenstoffhaltigen Verbindungen sind die Silane der Formel XVIa

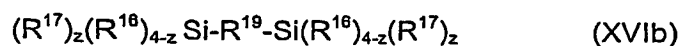


20

- wobei die Reste R¹⁶, die gleich oder verschieden sein können, unabhängig voneinander für eine Gruppe A und vorzugsweise für Halogen, insbesondere Cl oder Br, C₁-C₄-Alkoxy, insbesondere Methoxy und Ethoxy, C₁-C₄-Acyloxy, insbesondere Acetyloxy stehen und die Reste R¹⁷, die gleich oder verschieden sein können, unabhängig voneinander für eine
- 25 Gruppe B und vorzugsweise für C₁-C₃₀-Alkyl oder C₃-C₁₀-Cycloalkyl, insbesondere Cyclohexyl, stehen und z einem Wert von 1, 2 oder 3 entspricht.

- Insbesondere zu nennen sind Dihalogensilane wie Dichlormethylcyclohexylsilan, Halogensilane wie Phenyldimethylchlorsilan, Trialkoxysilane wie Phenyltriethoxysilan, Trihalogensilane wie (2-Phenylethyl)trichlorsilan, , Dialkoxysilane wie Dimethoxymethylcyclohexylsilan und (C₃-C₁₆-Alkyl)_n-(C₁-C₄-alkoxy)_m-(chlor)_l-silane, wobei n, m und l unabhängig voneinander für einen Wert von 0, 1, 2 oder 3 stehen und die Summe aus n, m und l 4 beträgt.

- 35 Ebenfalls brauchbar sind Disilane der Formel (XVIb)



- worin R^{16} , R^{17} und z die oben genannten Bedeutungen besitzen und mehrere Reste R^{16} bzw. R^{17} gleich oder verschieden sein können und auch die Variablen z für die beiden Si-Atome gleiche oder verschiedene Bedeutungen annehmen können, und der Rest R^{19} für
- 5 Alkylen, insbesondere C_1 - C_6 -Alkylen, Cycloalkylen, insbesondere C_3 - C_{10} -Cycloalkylen, Arylen, insbesondere Phenylen oder Biphenylen, oder O steht, wobei Alkylen 1-, 2-, 3- oder mehrfach durch eine Gruppe unterbrochen sein kann, die ausgewählt ist unter O, S, CO und CS. Hierzu gehören z.B. Bis(dialkoxy)silane.
- 10 Diese Verbindungen können in an sich bekannter Weise hergestellt und teilweise auch kommerziell bezogen werden.

- In der erfindungsgemäß zu verwendenden wäßrigen Lösung sind diese Verbindungen zumindest teilweise hydrolysiert. Vorzugsweise bilden sie eine kolloidale Lösung aus.
- 15 Verwendet werden insbesondere Lyosole und vor allem Hydrosole. Es handelt sich in der Regel um disperse Systeme.

- Brauchbare wäßrige Lösungen basieren auf Wasser und können zusätzliche weitere Lösungsmittel, insbesondere niedere Alkohole, wie Methanol, Ethanol und Isopropanol, Ketone wie Aceton, Ether wie Diethylether, Sulfoxide wie DMSO und andere mit Wasser
- 20 mischbare Lösungsmittel enthalten. Der Wasseranteil, bezogen auf das Gesamtgewicht an Lösungsmittel, beträgt wenigstens 30%, vorzugsweise wenigstens 50% und insbesondere wenigstens 80%.

- 25 Gemäß einer besonderen Ausführungsform verwendet man wäßrige Lösungen, die soviel Wasser enthalten, daß mehr als 10, vorzugsweise mehr als 20 und insbesondere mehr als 40%, vorteilhafterweise 10 bis 99%, bevorzugt 25 bis 75%, insbesondere etwa 50% aller hydrolysierbaren Gruppen hydrolysiert sind. Bei der sauren Verfahrensvariante liegt der pH-Wert der Lösung in der Regel unterhalb von 7, vorzugsweise bei 2 bis 5 und
- 30 insbesondere bei 3 bis 4 und kann mit geeigneten Säuren, z.B. Chlorwasserstoffsäure oder Essigsäure, auch als wäßrige Lösung, eingestellt werden.
- Andererseits kann man auch unter basischen Bedingungen hydrolysieren, z.B. durch Zusatz von Ammonium- und Alkalimetallhydroxiden.

- 35 Die zu verwendenden Lösungen enthalten wenigstens eine hydrolysierbare kohlenstoffhaltige Verbindung. Ferner kann die Lösung weitere hydrolysierbare Verbindungen ähnlichen Typs als Beimischung, z.B. zwecks Vernetzung, enthalten. Zu nennen wären

hier insbesondere Tetraalkoxysilane, Bis(trialkoxysilane sowie oligomere und polymere Dialkylsiloxane.

- Bevor die zu behandelnde Glas-, Metall- oder Keramikoberfläche mit der wäßrigen
- 5 Lösung der hydrolysierbaren kohlenstoffhaltigen Verbindung in Kontakt gebracht wird, ist es von Vorteil, die Oberfläche zu reinigen. Dies kann in an sich bekannter Weise geschehen, z.B. mit entfettenden Mitteln, z.B. Isopropanol und/oder Diethylether, und/oder Ultraschall.
- 10 Vorzugsweise wird die Oberfläche mit der wäßrigen Lösung beschichtet. Zu diesem Zweck kann man übliche Beschichtungsverfahren anwenden, beispielsweise Tauchen, Fluten, Ziehen, Gießen, Schleudern, Spritzen oder Aufstreichen. Bevorzugt ist das Tauchen. Die Durchführung dieses Vorgangs und dessen Optimierung erfolgt durch den Fachmann.
- 15 Anschließend wird die Oberfläche und die damit in Kontakt stehende wäßrige Lösung der hydrolysierbaren kohlenstoffhaltigen Verbindung erwärmt. Lösungsmittel verdampft und die Beschichtung härtet aus.
- 20 Trocknung meint in diesem Zusammenhang das Entfernen von Lösungsmittel, insbesondere von Wasser. Wenigstens ein Teil des Lösungsmittels wird entfernt. Von Vorteil ist die im wesentlichen vollständige Entfernung von Wasser. Die Trocknung kann durch Erwärmen unterstützt werden. Üblicherweise erfolgt die Erwärmung bei Temperaturen in einem Bereich von 20 bis 500°C und vorzugsweise 50°C bis 200°C.
- 25 Die ausgehärteten Schichten weisen üblicherweise Dicken im Bereich zwischen 2 µm und 30µm auf. Bevorzugt sind Schichtdicken in inem Bereich von 2 bis 10 µm und insbesondere von 2 bis 5 µm.
- 30 Mit dieser Technik lassen sich Trägermaterialien behandeln, welche funktionelle Gruppen aufweisen, die mit der hydrolysierten kohlenstoffhaltigen Verbindung kondensieren können.
- Die erfindungsgemäßen kohlenstoffhaltigen Oberflächen zeichnen sich durch geringe
- 35 Rauigkeit aus. Vorteilhafterweise beträgt der R_a -Wert weniger als 0,5 µm, vorzugsweise weniger als 0,2 µm und insbesondere weniger als 0,1 µm.

Die erfindungsgemäßen kohlenstoffhaltigen Oberflächen zeigen auch ein ausgeprägtes wasserabweisendes Verhalten. Vorteilhafterweise beträgt der Kontaktwinkel mehr als 60°, vorzugsweise mehr als 70° und insbesondere mehr als 80°.

- 5 Gemäß einer besonderen Ausführungsform weisen Teile der Trägeroberfläche erfindungsgemäßer Arrays weitere Überzüge auf, an die keine Chinone gekoppelt sind. Geeignet sind insbesondere Metalle, z.B. Kupfer, Titan, Chrom, Gold und vor allem Platin, oder Polymere. So geben derartige Beschichtungen zweckmäßigerweise eine Oberflächenstrukturierung vor, wonach die Plätze, an denen Biomoleküle immobilisiert sind, keine
10 derartige Beschichtung aufweisen, während die Teile der Oberfläche mit einer derartigen Beschichtung keine immobilisierten Biomoleküle aufweisen. Derartige Arrays können vorteilhafterweise eine präzisere Kopplung von Chinonen auf definierten Flächen aufweisen.
- 15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind im Sinne eines Vorprodukts auch Träger, deren Oberflächen partiell mit zweckmäßigen Materialien überzogen sind. Bevorzugt sind Träger mit einer strukturierten Beschichtung (Vorstrukturierung), wobei Aussparungen in der Beschichtung definierte Plätze (Array) vorgeben, auf denen anschließend Biomoleküle immobilisiert werden können.
- 20 Träger im erfindungsgemäßen Sinn sind in der Regel Materialien mit starrer oder halbstarrer Oberfläche und in diesem Sinne als fest zu bezeichnen. Üblich sind planare Oberflächen. In bestimmten Fällen kann es aber von Vorteil sein, profilierte Träger zu verwenden. Erhebungen und Vertiefungen, wie Stufen, Rillen, Kanäle, Kerben, beispielsweise V-Kerben oder Mesa-Strukturen sind möglich. Diese Strukturen können so auf der Oberfläche
25 angeordnet sein, daß sie die Immobilisierung der Biomoleküle zweckmäßig beeinflussen. Beispielsweise bei der lichtgesteuerten Kopplung kann einfallendes Licht durch derartige Strukturen der Trägeroberfläche gezielt beeinflußt, beispielsweise gespiegelt und sogar focussiert werden, Kanäle können zum Führen von Flüssigkeit dienen.
- 30 Zumindest Teile der Oberfläche derartiger Träger entsprechen den erfindungsgemäßen Vorgaben.

- Die Form eines Trägers kann mannigfaltig sein und richtet sich in erster Linie nach der Art der noch zu beschreibenden Verwendung des Trägers. Es kann sich beispielsweise um
35 Objektträger, Mikrotiterplatten, Röhrchen, Chips, Dipsticks, Stempel, Caps, Partikel, Stränge, insbesondere Faserbündel, sphärische Körper, wie Kugeln oder Kügelchen, Fällungsprodukte, Membranen, Gele, Blätter, Behältnisse, Kapillaren, Scheiben, Folien

oder Platten handeln. Auch Wafer-Formate können als Träger dienen, die gewünschtenfalls vereinzelbar sind. Die Träger können ferner mit weiteren zweckmäßigen Bauteilen versehen sein, beispielsweise kann man Chips einkapseln. Gemäß einer besonderen Ausführungsform ist ein Körper, insbesondere in Form eines Dipsticks, mit einem

5 Verschußmittel, z.B. einem Schnapp- oder Schraubdeckel versehen, der, aufgesetzt auf ein passendes Behältnis, insbesondere ein Inkubationsgefäß, die auf dem Körper immobilisierten Biomoleküle mit einem im Behältnis befindlichen Probenfluid in Kontakt bringen kann. Der Körper hat vorzugsweise die Form eines Stiftes, an dessen einem

10 Ende das Verschußmittel und an dessen anderem Ende zweckmäßigerweise die Biomoleküle immobilisiert sind. So entspricht wenigstens ein Teil der Oberfläche des Körpers den erfindungsgemäßen Vorgaben. Praktischerweise kann der Körper aus dem Polymer auf Polycycloolefin-Basis oder einem geeigneten Verbundwerkstoff mit entsprechenden Oberflächenteilen gefertigt sein. Ferner können mehrere Dipsticks – auch gemäß

15 der vorstehend erläuterten Ausführungsform – vereinzelbar miteinander verbunden sein.

Die für die Kopplung zur Verfügung stehende Oberfläche des Trägers kann übliche Dimensionen haben. Vorzugsweise ist diese Oberfläche und damit der Array kleiner als 1 cm² und insbesondere kleiner als 0,5 cm².

20 Die Plätze, an denen Biomoleküle immobilisiert sind, also insbesondere Felder immobilisierter Biomoleküle, können unterschiedliche Geometrien aufweisen. Prinzipiell kann die Form beliebig sein, z.B. kreisförmig, rechteckig, quadratisch oder elliptisch. Die Fläche beträgt vorzugsweise weniger als 1 mm², insbesondere weniger als 10000 µm², und ganz besonders bevorzugt weniger als 1000 µm².

25 Gemäß einer besonderen erfindungsgemäßen Ausführungsform sind Biomoleküle als Spots immobilisiert, d.h. als im wesentlichen kreisförmige Felder. Derartige Spots haben vorzugsweise Durchmesser in einem Bereich von 1 µm bis 1000 µm, insbesondere 5 µm bis 20 µm oder 50 µm bis 500 µm. Insbesondere Spots mit Durchmessern unterhalb von

30 200 µm und vor allem unterhalb von 20 µm lassen sich mit der oben beschriebenen Vorstrukturierung vorteilhaft verwirklichen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform erfindungsgemäßer Arrays handelt es sich bei den Biomolekülen um Nukleinsäuren, insbesondere Oligonukleotide mit einer Länge

35 von 2 bis 500 Basen. In der Regel sind die immobilisierten Oligonukleotide in der Lage, an eine Target-Nukleinsäure zu binden. In diesem Sinne werden die immobilisierten Oligonukleotide auch als Sonden bezeichnet.

Die Sonden sind in der Regel einzelsträngige Oligomere. DNA, RNA sowie Nukleinsäure-Analoga und -Derivate, wie, gegebenenfalls modifizierte, PNA, LNA und PSNA sowie modifizierte DNA oder RNA können verwendet werden. Die Mindestlänge der Sonden
5 hängt ab von der Komplexität der Probe, insbesondere der Anzahl der Basen nachzuweisender Nukleinsäuren, aber auch von der Art des als Sonde verwendeten Nukleinsäuretyps und der erreichbaren thermodynamische Stabilität zwischen Probe und Sonde.

In Abhängigkeit vom Nukleinsäuretyp weisen Sonden üblicherweise eine Länge von 8 bis
10 60, vorzugsweise von 13 bis 25 und insbesondere von 13 Basen für DNA, von 8 bis 60, vorzugsweise von 13 bis 25 und insbesondere von 13 Basen für DNA-LNA Hybride, von 8 bis 60, vorzugsweise von 13 bis 25 und insbesondere von 13 Basen für PSNA, von 6 bis 30, vorzugsweise von 8 bis 18 und insbesondere von 9 Basen für LNA, und von 6 bis 18, vorzugsweise von 8 bis 18 und insbesondere von 9 Basen für PNA auf.

15 Bei relativ geringer Komplexität der nachzuweisenden Nukleinsäuren, z.B. Amplifikaten, insbesondere PCR-Amplifikaten, Viren, Plasmiden und Mikroorganismen, insbesondere für Anwendungen wie den Nachweis von Mutationen, SNPs oder Methylierungen (Epigenetics), sind relativ kurze Sonden, etwa im Bereich von 8-25meren und insbesondere 8-
20 15meren, zweckmäßig. Bei relativ hoher Komplexität der nachzuweisenden Nukleinsäuren, z.B. nichtamplifizierter RNA; über cDNA gesamtamplifizierter RNA, nichtamplifizierter gesamtgenomischer DNA und amplifizierter gesamtgenomischer DNA, insbesondere für Anwendungen wie Genexpressions-Bestimmungen oder den Nachweis genomischer Amplifikationen bzw. Deletionen, sind längere Sonden, etwa im Bereich von 16-60meren
25 und insbesondere 25-50meren für synthetische Sonden, zweckmäßig oder die Sonden bestehen aus PCR-Produkten, cDNA, Plasmiden oder DNA aus lysierten Bakterien, die auch eine darüber hinaus gehende Basenanzahl aufweisen können.

Die Basenabfolge der Sonden richtet sich vornehmlich nach ihrer Funktion. Eine Testson-
30 de weist in der Regel eine Basenabfolge auf, die zu einer bestimmten Targetsequenz einer nachzuweisenden Nukleinsäure komplementär ist oder einem anderen Aspekt zufolge mit der Targetsequenz spezifisch hybridisieren kann. Eine Kontrollsonde kann insbesondere die Funktion einer Normalisierungs-, Mismatch-, Housekeeping-, Probenzubereitungs-, Hybridisierungs- oder Amplifikationskontrolle haben und dementsprechend
35 eine Basenabfolge aufweisen, die komplementär ist zu einer Basenabfolge einer Referenz-Nukleinsäure, einer nachzuweisenden Nukleinsäure mit ähnlicher Basenabfolge, einer konstitutiv exprimierten Nukleinsäure, z.B. einer vom β_2 -Mikroglobulin, β -Aktin-,

GAPDH-, PBGD-, Ubiquitin-, Tubulin- oder Transferrin-Rezeptor-Gen abgeleiteten Nukleinsäure, einer speziesspezifischen Nukleinsäure bzw. eines Amplifikats.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen,

- a) wobei man wenigstens ein Derivat einer Kopplungsgruppe, vorzugsweise ein Chinonderivat, auf einen Träger mit kohlenstoffhaltiger Oberfläche aufbringt, belichtet und erforderlichenfalls die immobilisierten Derivate in die Biomoleküle überführt, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß man als kohlenstoffhaltige Oberfläche wenigstens ein Polycycloolefin verwendet; oder
- b) wobei man eine Trägeroberfläche mit wenigstens einer hydrolysierbaren kohlenstoffhaltigen Verbindung behandelt, wenigstens ein Derivat einer Kopplungsgruppe, vorzugsweise ein Chinonderivat, auf die kohlenstoffhaltige Trägeroberfläche aufbringt, belichtet und erforderlichenfalls die immobilisierten Derivate in die Biomoleküle überführt, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine wässrige Lösung der hydrolysierbaren kohlenstoffhaltigen Verbindung verwendet.

Erfindungsgemäße Ausgestaltungen dieses Gegenstandes werden ebenfalls anhand der bevorzugten, auf Chinone gerichteten Ausführungsform stellvertretend für weitere geeignete Kopplungsgruppen beschrieben.

Zur Kopplung des Chinons an die kohlenstoffhaltige Oberfläche wird belichtet. Belichtung meint hier das Einstrahlen elektromagnetischer Strahlung zwecks Chinonaktivierung. Es sollte sich dabei um eine nichtionisierende Strahlung handeln, deren Wellenlänge in der Regel im UV-VIS-Bereich liegt. Die Strahlung sollte möglichst wenig mit weiteren funktionellen Gruppen der Chinonderivate wechselwirken. Aus praktischen Gründen wird üblicherweise inkohärentes kontinuierliches Licht verwendet. Ebenfalls kann monochromatisches, polarisiertes, gepulstes oder kohärentes Licht verwendet werden. Geeignete Lichtquellen sind bekannt und können in der Regel kommerziell bezogen werden.

Die Belichtungszeit bemisst sich an einer effektiven Kopplung der Chinone an die kohlenstoffhaltige Oberfläche bei minimaler Zersetzung des Chinonderivats. In der Regel beträgt die Belichtungszeit weniger als 200 Minuten. Bevorzugt sind Belichtungszeiten von weniger als 60 Minuten, vor allem von weniger als 10 Minuten und insbesondere von weniger als 5 Minuten.

Diese Verfahrensweise hat den Vorteil, daß die Oberfläche vor der Kopplung nicht - wie üblich durch chemische Modifizierung - aktiviert werden muß und demnach auch eine ansonsten in der Regel benötigte Schutzgruppen-Abspaltung entfällt.

- 5 Das aufzubringende Chinonderivat basiert auf wenigstens einer funktionalisierten Chinonstruktur und kann Spacer und/oder Biomoleküle bzw. -derivate oder Teile davon aufweisen. Beispielsweise können Funktionalitäten an Spacern und/oder Biomolekülen geeignete Schutz- oder Aktivierungsgruppen aufweisen.
- 10 Die sich hieraus ergebenden Vorgehensweisen zur Immobilisierung von Biomolekülen können grundsätzlich unterschieden werden in eine Variante, bei der das Biomolekül während der Chinonkopplung zugegen ist, und einer anderen Variante, bei der das Biomolekül erst nach erfolgter Chinonkopplung an ein bereits immobilisiertes Chinonderivat angefügt wird. Die im Einzelfall zu wählende Variante hängt von der Art des Biomole-
- 15 küls und dessen Synthese ab.

- So kann es beispielsweise zweckmäßig sein, zunächst das funktionalisierte Chinon gegebenenfalls unter Zwischenschaltung eines Spacers an das Biomolekül zu binden und dieses vorgefertigte Konstrukt anschließend an die kohlenstoffhaltige Oberfläche zu
- 20 koppeln. Diese Variante bietet den Vorteil, daß die vorgefertigten Konstrukte als Substanz – erforderlichenfalls nach zweckmäßiger Aufreinigung und vorteilhafterweise charakterisiert - im wesentlichen homogen sein können, so daß die Qualität des resultierenden Arrays vor allem durch die Kopplungsreaktion bestimmt wird. Hier bietet die vorliegende Erfindung wiederum vorteilhafte Ausgestaltungen, die einerseits zu einer effektiven und
- 25 reproduzierbaren Kopplung beitragen, andererseits eine Kontrolle des Kopplungsergebnisses und damit des Arrays ermöglichen.

- Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des vorliegenden Verfahrens werden daher vorgefertigte, Chinon und Biomolekül bzw. Derivate davon aufweisende Konstrukte
- 30 (gegebenenfalls unter Verwendung von Spacern und anderen Linkern) auf die kohlenstoffhaltige Oberfläche aufgebracht und belichtet. Erforderlichenfalls kann sich eine Überführung der immobilisierten Konstrukte in die gewünschten Biomoleküle anschließen, in der Regel ist dies aber nicht erforderlich. Diese Ausführungsform findet vor allem Anwendung auf Nukleinsäuren und insbesondere Oligonukleotide.

35

Dazu werden die Nukleinsäure zunächst in an sich bekannter Weise bereitgestellt. Oligonukleotide können bequem mit Festphasen-Synthesemethoden, wie der Phosphat-

- diesterkopplungs- oder Phosphoramidit-Methode synthetisiert werden. Für PNAs kommen geeignete Peptid-Synthesesysteme zur Anwendung. Eine andere Möglichkeit verwendet Nukleinsäuren natürlichen Ursprungs als Templat zur Erzeugung erfindungsgemäß geeigneter Nukleinsäuren, beispielsweise in Form von cDNA, ccDNA, RNA oder cRNA.
- 5 Hier sind vor allem Amplifikate, insbesondere PCR-Produkte zu nennen.

- Für die Bindung an funktionalisiertes Chinon oder Spacer ist die Nukleinsäure erforderlichenfalls an geeigneter Stelle zu modifizieren, beispielsweise durch Umsetzung mit Amino-Modifikatoren oder Biotin-Analoga, wie z.B. aktivierbaren Arylazidderivaten von
- 10 Biotin. Die Bindung am 5'-Ende der Nukleinsäure ist bevorzugt.

- Das Chinon wird vorzugsweise als Carbonsäure oder reaktives Acylderivat, beispielsweise als Carbonsäurehalogenid, mit geeigneten Spacern, Biomolekülen oder Spacer-Biomolekül-Konstrukten bzw. zweckmäßigen Derivaten davon umgesetzt. Diese Umsetzung erfolgt in an sich bekannter Weise je nach Art der zu realisierenden Bindung. Der
- 15 Aufbau von Spacern kann dabei auch schrittweise erfolgen, beispielsweise indem man sukzessive ausgehend vom funktionalisierten Chinon zunächst die einzelnen Linker und schließlich das oder die Biomoleküle anfügt, oder einerseits das funktionalisierte Chinon mit einem oder mehreren Linkern und andererseits das Biomolekül mit einem oder
- 20 mehreren Linkern umsetzt und anschließend die resultierenden Konstrukte zusammenfügt. Sollen Amplifikate, insbesondere PCR-Produkte, immobilisiert werden, so kann man zunächst die zu verwendenden Primer mit dem Chinon, gegebenenfalls unter Zwischenschaltung von Spacern, derivatisieren. Das Amplifikat weist dann bereits das Chinon auf und kann in der Regel direkt an die Oberfläche gekoppelt werden.

- 25 In bestimmten Fällen kann es allerdings erforderlich und auch zweckmäßig sein, daß das Biomolekül während der Chinonkopplung nicht zugegen ist. Dies ist insbesondere dann sinnvoll, wenn sich die Kopplungsbedingungen auf das Biomolekül auswirken. Ein anderer Fall betrifft die Möglichkeit, die Biomoleküle im Anschluß an die Kopplung
- 30 ausgehend von den immobilisierten Chinonderivaten sukzessive zu synthetisieren.

- Grundsätzlich können dazu die bekanntermaßen bei der Festphasensynthese von Nukleinsäuren und Peptiden zur Anwendung kommenden Methoden eingesetzt werden. Sollen verschiedene Biomoleküle, vor allem Oligonukleotide und Peptide mit unterschiedlichen Sequenzen parallel synthetisiert werden, können mittels photoaktivierbarer
- 35 Schutzgruppen und selektiver Bestrahlung nur diejenigen Oligomere entschützt werden, die dann mit einem bestimmten weiteren Baustein versehen werden sollen. Die selektive

Bestrahlung erfolgt in der Regel über geeignete lithographische Masken. Zur weiteren Erläuterung sei hier auf die grundlegenden Ausführungen hierzu in dem US-Patent 5,744,305 verwiesen.

- 5 In der Regel wird das Chinonderivat in Lösung auf die kohlenstoffhaltige Trägeroberfläche aufgebracht. Geeignete Lösungsmittel sollten mit dem Chinonderivat und insbesondere dem photoaktivierten Chinonderivat kompatibel sein. Darüber hinaus ist es von Vorteil, daß die gleichmäßige Verteilung der Chinonderivate auf der Oberfläche vor dem Ver-
- 10 dampfen des Lösungsmittels erfolgt ist. Vorzugsweise ergibt sich eine homogene Verteilung der Chinonderivate auf der behandelten Oberfläche, wobei es insbesondere bevorzugt ist, daß die behandelte Oberfläche mit Chinonderivaten gesättigt ist.

- Prinzipiell können wäßrige und organische Lösungsmittel verwendet werden. Bevorzugt sind wäßrige Lösungsmittel. Diese können organische Lösungsmittel enthalten. Vorzugs-
- 15 weise beträgt der Anteil an organischen Lösungsmitteln weniger als 10 Vol.-% und insbesondere weniger als 5 Vol.-%. Zu geeigneten organischen Lösungsmitteln gehören niedere Alkohole, wie Methanol, Ethanol und 1-Propanol, Ketone wie Aceton, Ether wie Diethylether, Sulfoxide wie DMSO und andere mit Wasser mischbare Lösungsmittel. Wäßrige Lösungen mit einem Propanolgehalt von etwa 1 bis 10 Vol.-%, insbesondere
- 20 etwa 5% haben sich als zweckmäßig erwiesen.

- Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens setzt man der aufzubringenden Lösung ein hygroskopisches Salz zu. Bevorzugt ist Calcium-
- 25 chlorid. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, das hygroskopische Salz im mM-Bereich zuzusetzen, vorzugsweise etwa 0,1 mM bis 200 mM, vorzugsweise 1 mM bis 50 mM und insbesondere etwa 50 mM.

- Zum Aufbringen der Chinonderivate sind prinzipiell alle Techniken geeignet, die eine definierte und reproduzierbare Abgabe einer bestimmten Flüssigkeitsmenge erlauben.
- 30 Beispielsweise können Techniken wie Pipettieren, Dispensieren, Drucken, Stempeln zur Anwendug kommen.

- Brauchbar sind beispielsweise kontaktfreie Verfahren wie Piezodispenser und Druckpuls-
- 35 dispenser. Hier hat sich die Kontrolle von Temperatur und relativer Luftfeuchte zur Vermeidung von Satellitenspots als zweckmäßig erwiesen. Vor allem bei Kunststoffträ-
gern ist die Erdung des Trägermaterials zur Ableitung von elektrostatischer Ladung sinnvoll.

Brauchbar sind auch kontaktierende Verfahren, wie Kapillardispenser (vgl. z.B. PCT/DE 00/03447), welche die Flüssigkeit mit einer dünnen Kapillare, beispielsweise mit einem Innendurchmesser von 1,5 bis 5 μm , auftragen, und die sogenannte Pin- und Ring-
5 Technologie. Über die Polarität des zu dispensierenden Mediums kann ein optimaler Tropfenabriß gewährleistet werden, z.B. durch Zusatz von Salz oder Lösungsmitteln wie Ethanol oder 1-Propanol.

Die abgegebene Flüssigkeitsmenge ist von Bedeutung, da sie die Fläche, auf der die
10 Biomoleküle immobilisiert werden, also insbesondere die Spotgröße bestimmt. In der Regel werden Flüssigkeitsmengen im Femto- bis Nanoliter-Bereich aufgebracht. So sind Spots mit einem Durchmesser von etwa 150 bis 200 μm mit einer kontaktfrei aufgebracht
Menge von etwa 0,5 nl bis 1,5 nl erhältlich. Spots mit Durchmessern im Bereich von 10 μm können erzeugt werden, indem man mittels Kapillardispensern Mengen von etwa 1
15 pl aufbringt.

Gemäß einer besonders vorteilhaften Ausführungsform wird die zum Aufbringen der Flüssigkeit verwendete Vorrichtung, also insbesondere ein Dispensor, z.B. Piezodispenser, zwischen dem Aufbringen bzw. Dispensieren zweier sich unterscheidender Fluide,
20 beispielsweise unterschiedliche Sonden enthaltender Flüssigkeiten, mit Natriumhydroxid gespült. Zweckmäßige Spüldauern liegen in einem Bereich von wenigen Sekunden bis wenigen Minuten, vorzugsweise bei etwa 10 bis 60 Sekunden. Eine etwa 0,1 normale wässrige Lösung von Natriumhydroxid hat sich als geeignet erwiesen. Diese Vorgehensweise führt vor allem bei Dispensoren mit polaren Oberflächen, wie Glaskapillaren, Quarz,
25 Silizium, Metallen bzw. Metalloxid-Überzügen, zu entscheidenden Vorteilen. Insbesondere kann dadurch die Qualität der Arrays verbessert werden, was sich in einer besseren Stringenz und/oder weniger falsch positiven Signalen darstellt.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden
30 die Chinonderivate auf eine vorstrukturierte Oberfläche aufgebracht. Dazu werden Teile der Oberfläche derart behandelt, daß Chinonderivate an die behandelten Flächen im wesentlichen nicht koppeln. Beispielsweise kann man Teile der Oberfläche mit Materialien beschichten, die unter den Kopplungsbedingungen im wesentlichen nicht mit den Chinonderivaten reagieren. Hierzu gehören vor allem Metalle, wie Chrom, Kupfer, Titan,
35 Platin, Gold und dergleichen, weitere anorganische Materialien, wie Gläser oder Keramiken, sowie organische Materialien, Polymere eingeschlossen. Ferner kommt auch eine Plasmabehandlung der Oberfläche, beispielsweise mit Argonplasma, in Betracht.

Gemäß einer bevorzugten Ausgestaltung dieser Ausführungsform bringt man zunächst eine Metallschicht, vorzugsweise eine Platin- oder Chromschicht, auf die kohlenstoffhaltige Oberfläche auf. Dies kann in an sich bekannter Weise erfolgen, beispielsweise kann
5 das Metall gesputtert oder aufgedampft werden. Anschließend werden die Teile der aufgetragenen Schicht wieder entfernt und damit die Teile der kohlenstoffhaltigen Oberfläche wieder freigelegt, auf denen Biomoleküle immobilisiert werden sollen. Auch das Entfernen von Teilen der Metallschicht kann in an sich bekannter Weise erfolgen. Beispielsweise kann man einen zu diesem Zweck herkömmlicherweise verwendeten
10 Photolack auftragen, diesen über eine geeignete Maske, in der Regel eine photolithographische Maske, an den Stellen belichten, an denen das Metall anschließend, beispielsweise durch Ätzen, entfernt werden soll. Auf diese Art und Weise kann durch die Wahl einer bestimmten Maske mit Aussparungen definierter Größe und Form die kohlenstoffhaltige Oberfläche als Abbild dieser Maske in kopplungsfähige und nicht kopplungsfähige
15 Bereiche unterteilt werden.

Alternativ kann auch zunächst Photolack auf die kohlenstoffhaltige Oberfläche aufgetragen werden. Dieser wird dann über eine inverse Maske belichtet und entwickelt, so daß anschließend Metall auf diejenigen Teile der Oberfläche aufgetragen werden kann, an
20 denen Biomoleküle nicht immobilisiert werden sollen. Diejenigen Stellen, an denen Biomoleküle immobilisiert werden sollen, sind zunächst noch mit Photolack überzogen, der vor Kopplung der Biomoleküle in geeigneter Weise, beispielsweise mit zweckmäßigen Lösungsmitteln wie Aceton, entfernt wird.

25 Zusätzlich zum Auftragen definierter und reproduzierbarer Flüssigkeitsmengen bietet diese Ausführungsform insbesondere den Vorteil, die Form und die maximale Fläche eines Platzes zur Immobilisierung von Biomolekülen wählen zu können.

Nach dem Aufbringen der Chinonderivate läßt man in der Regel zunächst das Lösungsmittel verdampfen. Dies kann wegen relativ geringer Flüssigkeitsmengen normalerweise bei Raumtemperatur erfolgen, kann aber auch durch Wahl geeigneter höherer oder niedrigerer Temperaturen beeinflusst werden. Die Kopplungsreaktion erfolgt demgemäß im wesentlichen nicht in Lösung, wobei allerdings ein Restgehalt an Lösungsmittel von
30 Vorteil sein kann.

35 Im Anschluß an die Belichtung und die damit einhergehende Kopplung von Chinonen an die kohlenstoffhaltige Oberfläche wird in der Regel ein Waschvorgang durchgeführt.

Zweck dieses Waschvorgangs ist es insbesondere, nicht gekoppelte Chinonderivate zu entfernen. In Anlehnung an die zuvor zum Aufbringen des Chinonderivats verwendete Lösung werden zum Waschen ebenfalls wäßrige Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische verwendet. Prinzipiell gelten obige Ausführungen hier entsprechen.

5

Gemäß einer besonderen Ausführungsform wäscht man mit einem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch, das ein Tensid, vorzugsweise ein nichtionisches Tensid, enthält. Besonders bevorzugt sind polyalkoxylierte, insbesondere polyethoxylierte Fettsäureester von Polyolen, insbesondere von Glycerin oder Sorbitol, beispielsweise die unter dem Handelsnamen Tween® vertriebenen Sorbitanfettsäureester. Insbesondere hat sich die Verwendung von ethoxyliertem Sorbitanhexylaurat als zweckmäßig erwiesen.

10

Die Konzentration an Tensid in der Waschlösung wird zweckmäßigerweise so gewählt, daß einerseits eine effektive Entfernung nicht gekoppelter Chinonderivate gewährleistet ist, andererseits die Waschlösung mit den immobilisierten Biomolekülen kompatibel ist. Konzentrationen im Bereich von 0,01 Gew.-% bis 10 Gew.-% und vorzugsweise 0,05 Gew.-% bis 2 Gew.-% haben sich als zweckmäßig erwiesen.

15

Beispielsweise kann die Trägeroberfläche nach Belichtung mit einer etwa 0,5 Gew.-% bis etwa 2 Gew.-% Tween 20 enthaltenden Lösung gewaschen, insbesondere in diese Lösung getaucht werden. Zweck dieses ersten Waschvorgangs ist es insbesondere, eine Ankopplung der zu entfernenden Reagentien zu vermeiden. Anschließend kann die Trägeroberfläche dann mit einer etwa 0,01 Gew.-% bis etwa 0,05 Gew.-% Tween 20 enthaltenden Lösung gespült werden.

20

25

Die Konzentration der Chinonderivate in der aufzubringenden Lösung ist variabel und richtet sich insbesondere nach der gewünschten Dichte immobilisierter Biomoleküle. Konzentrationen im Bereich von 0,1 μM bis 100 μM können eingesetzt werden, wobei im unteren Konzentrationsbereich in bestimmten Fällen eine Absättigung der Oberfläche mit Chinonen nicht erreicht wird, während dies im oberen Konzentrationsbereich der Fall ist und überschüssige Chinonderivate, die aufgrund der Sättigung nicht gekoppelt haben, anschließend entfernt werden können. Konzentrationen oberhalb von wenigstens 5 μM haben sich zwecks Sättigung der Oberfläche bei zufriedenstellender Homogenität der immobilisierten Biomoleküle als zweckmäßig erwiesen.

30

35

Nach dem Waschen mit tensidhaltigem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch können sich weitere Waschschriffe anschließen. Dazu kann es zweckmäßig sein, organische

Lösungsmittel, insbesondere niedere Alkohole, beispielsweise Isopropanol, zu verwenden, die dann anschließend durch Spülen mit Wasser wieder entfernt werden können.

Schließlich trocknet man die Oberfläche unter üblichen Bedingungen, bequemerweise bei
5 Umgebungstemperatur und gewünschtenfalls durch Trockenblasen durch Luft oder Inertgas.

Sind die immobilisierten Biomoleküle gemäß obiger besonderer Ausführungsform mit einer Markierung versehen, so kann sich nun eine Qualitätskontrolle des Arrays anschlie-
10 ßen. Dazu kann der Array mit einem der Markierung entsprechenden Detektionssystem vermessen werden. Über die gemessene Menge an immobilisierter Markierung lassen sich insbesondere die Kopplungseffizienz und damit die Immobilisierung der Biomoleküle in Bezug auf Fläche, Homogenität und Dichte beurteilen.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung erfindungsgemäßer Arrays für analytische und insbesondere diagnostische Zwecke.

Beispielhaft seien folgende Anwendungen genannt:
Diagnostik, Therapiewahl und Therapiekontrolle von Tumor- und Stoffwechselerkrankun-
20 gen; Untersuchung der genetischen Prädisposition (SNPs), insbesondere die Detektion von Mutationen, auch im forensischen Bereich; Nachweis von Promotormethylierungen (Epigenetics); Genexpressionskontrolle; Sequenzierung, insbesondere Sequenzierung durch Hybridisierung; Mikrobiologische Anwendungen wie in Bakteriologie und Virologie, beispielsweise zur Differenzierung verschiedener Stämme; ELISA-Anwendungen mit
25 immobilisierten Antikörpern, Antigenen, Rezeptoren und Liganden in der klinischen Chemie bis hin zur Lebensmittelchemie und Umweltanalytik; Allergiediagnostik mit immobilisierten Allergene; High Throughput Screening von Substanzbibliotheken; Toxicogenomics.

30 Prinzipiell eignen sich erfindungsgemäße Arrays sowohl für nichtkompetitive als auch für kompetitive analytische Verfahren (Assays).

Bei nichtkompetitiven Assays tritt die zu analysierende Substanz (Analyt) mit den auf der Oberfläche immobilisierten Biomolekülen in Wechselwirkung. In der Regel wird der Analyt
35 zuvor markiert, möglich ist aber auch eine Markierung, nachdem der Analyt bereits mit den immobilisierten Biomolekülen in Wechselwirkung getreten ist, z.B. mittels Primer Extension oder Rolling-Cycle-PCR. In diesen Fällen erhält man ein Meßsignal, das um so

- größer ist, je mehr Analyt vorhanden ist. Es ist auch möglich, daß durch die Wechselwirkung der Probe mit den auf der Oberfläche immobilisierten Substanzen die Fluoreszenz der immobilisierten Substanzen verändert wird (Abschwächung, Verstärkung, z.B. Molecular Beacons) oder die Aktivität eines Enzyms verändert wird und diese Änderung als Meßsignal registriert wird. Beispiele für nichtkompetitive Assays sind Hybridisierungsreaktionen von PCR-Produkten oder markierter DNA/RNA an auf der Oberfläche immobilisierte Nukleinsäuren, insbesondere Oligonukleotide oder cDNA, sowie Sandwichimmunoassays.
- 5
- 10 Bei kompetitiven Verfahren wird der Probe eine markierte Substanz (Marker) zugesetzt, die ähnliche Bindungseigenschaften zu den auf der Oberfläche immobilisierten Biomolekülen hat wie der Analyt selbst. Es findet eine Konkurrenzreaktion zwischen Analyt und Marker um die begrenzte Anzahl von Bindungsplätzen auf der Oberfläche statt. Man erhält ein Signal, das um so niedriger ist, je mehr Analyt vorhanden ist. Beispiele für
- 15 kompetitive Assays sind Immunoassays (ELISA) und Rezeptorassays.

- Die erfindungsgemäßen Arrays eignen sich zur Untersuchung beliebiger Proben biologischen Ursprungs, die einen bestimmten Analyt enthalten können. Eine Ausführungsform betrifft Körperproben humanen und tierischen Ursprungs. Erforderlichenfalls erfolgt eine vorbereitende Aufarbeitung des in der Probe vorhandenen Analyts oder einer Fraktion, die diesen Analyt enthalten kann. Diese Aufarbeitung entspricht in der Regel üblicher Praxis. Proben wie Blut und Blutbestandteile bzw. Isolate davon, Gewebe, nativ, gefroren, fixiert, mit und ohne Dissektion, Zellen aus Körperflüssigkeiten, z.B. Sputum, Lavagen, Punktate, Exsudate und Urin, oder Stuhl, können vorteilhaft mit erfindungsgemäßen Arrays untersucht werden. Derartige analytische Verfahren unter Verwendung der Arrays sind *in vitro* Verfahren (vgl. auch WO 99/10528 und WO 00/06702).
- 20
- 25

- Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform sind erfindungsgemäße Arrays für Hybridisierungsexperimente bestimmt. Zweckmäßigerweise sind auf der Trägeroberfläche Nukleinsäuren immobilisiert, die als Sonden mit bestimmten Targets hybridisieren können. Eine besondere Art derartiger Arrays sind Oligonukleotidarrays.
- 30

- Die Gestaltung der Sonden erfolgt insbesondere mit Blick auf das oder die Targets, die von analytischem Interesse sind (Analyt). So werden Testsonden in der Regel so gestaltet, daß sie mit einem definierten Target, beispielsweise einer bestimmten Basenabfolge, spezifisch hybridisieren. Von Bedeutung ist insbesondere eine gute Diskriminierung zwischen Perfect-Match und Mismatch (vgl. hierzu auch DE 100 09 081.8). Dazu können
- 35

die Schmelzpunkte der Hybride aus Sonde und Target sowie entsprechende Schmelzpunkte für definierte Mismatches nach dem Nearest-Neighbor-Modell berechnet und so Aussagen über die Diskriminierung von Perfect-Match und Mismatch getroffen werden. (vgl. z.B. J. J. SantaLucia: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95** (1998) 1460 und Peyret, e. al.: Biochemistry **38** (1999) 3468-3477).

Zur Hybridisierung bringt man die immobilisierte Sonde in Kontakt mit einem Hybridisierungsgemisch, das einen von der zu untersuchenden Probe nach zweckmäßiger Probenvorbereitung abgeleiteten Teil, und gegebenenfalls weitere zweckmäßige Zusätze umfaßt. Es versteht sich, daß Teile des Gemisches zunächst getrennt voneinander mit der Sonde in Kontakt gebracht werden können. Die Hybridisierungsbedingungen werden zweckmäßigerweise so gewählt, daß Sonde und dazu komplementäres Target stabile Hybride bilden können. Dazu werden in der Regel zunächst Bedingungen relativ niedriger Stringenz gewählt, z.B. Temperaturen von etwa 20–70 °C, vorzugsweise von etwa 20 – 50°C und insbesondere von etwa 30 – 40°C sowie Ionenstärken von etwa 6 x SSPE oder niedriger. Temperaturen im Bereich von 20–55 °C eignen sich insbesondere für Sondenlängen von weniger als 25meren; 40–70 °C sind insbesondere bei Sondenlängen ab 25meren geeignet. Anschließend kann dann bei ähnlicher oder höherer Stringenz, z.B. etwa 1 x SSPE bei etwa 30 – 40°C bis etwa 0,25 x SSPE bei etwa 30 – 50°C gewaschen werden. Es kann auch unter stringenten Bedingungen hybridisiert werden und der nicht gebundene markierte Probenanteil gewaschen werden. Ferner kann auf bekannte Agenzien, z.B. Detergenzien, Blockreagenzien, denaturierende Agenzien, die Renaturierung beschleunigende Agenzien und Tm-egalierende Reagenzien zurückgegriffen werden. Die Optimierung des Hybridisierungsprotokolls ist Sache des Fachmanns.

Für den Hybridisierungsschritt können amplifizierte oder nicht amplifizierte Nukleinsäuren eingesetzt werden. Brauchbar sind die bekannten Amplifikationsverfahren, zu denen die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), auch als Nested-PCR, Asymmetrische PCR oder Multiplex-PCR durchgeführt, oder alternative Verfahren, wie die Ligase-Kettenreaktion (LCR), Nukleinsäuresequenz-basierende Amplifikation (NASBA), Transkriptionsvermittelte Amplifikation (TMA) und ähnliche, gehören. Bestimmte Versionen dieser Techniken, wie die mutationsanreichernde PCR, und/oder Kombinationen mit anderen molekularbiologischen Methoden, wie mit der Reversen Transkription (RT), können zweckmäßig sein. Insbesondere ermöglichen die erfindungsgemäßen Arrays Hybridisierung ohne vorherige Amplifikation, insbesondere für den Nachweis von mRNA bzw. davon abgeleiteten Nukleinsäuren.

Der Nachweis im erfindungsgemäßen Sinn beinhaltet die Feststellung, ob ein bestimmtes Target (Analyt) in einer Probe vorhanden ist oder nicht (Anwesenheit oder Abwesenheit). Die Feststellung kann qualitativ oder quantitativ erfolgen.

- 5 In der Regel erfordert der Nachweis eine Quantifizierung derjenigen Nukleinsäuren, die an eine immobilisierte Sonde hybridisieren. Die Quantifizierung kann absolut oder relativ erfolgen. Geeignete Detektionssysteme sind dem Fachmann hinlänglich bekannt. Eine vielfach genutzte Möglichkeit besteht in der Einführung von Markierungen, z.B. radioaktiv, colorimetrischer, fluoreszierender oder lumineszierender Art. Diese werden in der
- 10 Regel in die in der Probe vorhandenen Nukleinsäuren und insbesondere in die nachzuweisenden Nukleinsäuren mit bestimmter Basenabfolge bzw. Nukleinsäuren mit dazu ähnlicher Basenabfolge eingeführt, z.B. im Zuge einer der Hybridisierung vorgeschalteten Amplifikation oder auf andere an sich bekannte Art und Weise.
- 15 Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele veranschaulicht.

Beispiele

Es zeigt

- 20 **Figur 1** die relative auf Standardobjektglasträger A (Menzel) bezogene Fluoreszenz verschiedener Trägermaterialien: B: Pyrex-Glas; C: Polymethylpenten (Permanox; Nunc); D: Polycycloolefin (Zeonex 480R; Zeon); E: Polycycloolefin (Zeonex 480; Zeon); F: Polycycloolefin (Topas; Hoechst); G: Polycarbonat (Nunc); H: Polystyrol (Nunc); I: Polystyrol auf Pyrex; J: CxHy auf Silicium (weich abgeschiedener Kohlenstoff; Plasma; über den Wasserstoffanteil läßt sich das H/C Verhältnis einstellen, Technik IMM Mainz); K: Teflon auf Pyrex; L: Gold auf Pyrex;
- 25 **Figur 2** die Fluoreszenz nach Hybridisierung einer Cy5-markierten 16mer-Oligonukleotid-Probe mit immobilisiertem 16mer-Oligonukleotid für verschiedene Trägermaterialien A: Polycycloolefin (Zeonex 480R; Zeon); B: Polystyrol auf Pyrexglas; C: Teflon auf Pyrexglas; D: CxHy auf Silicium. Es ist das Verhältnis von Signal- (weiße Balken) zu Hintergrundfluoreszenz (schwarze Balken) entnehmbar;
- 30 **Figur 3** die Fluoreszenz nach Hybridisierung einer Cy5-markierten 55mer-Oligonukleotid-Probe mit Polycycloolefin-immobilisiertem 18mer-Oligonukleotid, wobei zur Immobilisierung Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Oligonukleotids verwendet wurden (A: 1 µM; B: 3 µM;
- 35

C: 5 μ M), die jeweils 5-fach in einem Raster von 400 μ m als Spot aufgetragen wurden;

Figur 4

die Fluoreszenz nach Hybridisierung einer Cy5-markierten 55mer-Oligonukleotid-Probe mit Polycycloolefin-immobilisiertem 18mer-Oligonukleotid in Abhängigkeit von der Konzentrationen [μ M] des Oligonukleotids in der zur Immobilisierung verwendeten Lösung;

Figur 5

die Fluoreszenz nach Hybridisierung einer Cy5-markierten 55mer-Oligonukleotid-Probe mit Polycycloolefin-immobilisiertem 18mer-Oligonukleotid, wobei zur Immobilisierung eine 10 μ M Lösung des Oligonukleotids 5-fach in einem Raster von 400 μ m als Spot aufgetragen wurde;

Figur 6

die Fluoreszenz nach Hybridisierung einer Cy5-markierten 24mer-Oligonukleotid-Probe mit verschiedenen 13mer-Oligonukleotiden, die auf einem Cyclohexyl-silanisierten Glasobjektträger immobilisiert ist, wobei ein Oligonukleotid komplementär ist zur Probe (links, 2 Spots, Perfect Match) und ein weiteres Oligonukleotid mit der Probe eine Basenfehlpaarung aufweist (rechts, 2 Spots, Mismatch);

Figur 7

die Fluoreszenz nach Hybridisierung einer Cy5-markierten 24mer-Oligonukleotid-Probe mit Polycycloolefin-immobilisiertem AQ-gekoppeltem PCR-Amplifikat (A, 0.1 – 0.5 μ M), AQ-gekoppeltem PCR-Amplifikat (B, 0.01 – 0.05 μ M), nicht-AQ-gekoppeltem PCR-Amplifikat (C, 0.1 – 0.5 μ M);

Figur 8

die Fluoreszenz nach Hybridisierung einer Cy5-markierten 55mer-Oligonukleotid-Probe mit Polycycloolefin-immobilisiertem 18mer-Oligonukleotid, das zur Immobilisierung im Gemisch mit einem Anthrachinonderivat AQ-HEG-5'-T als Spot aufgetragen wurde, wobei der auf eine Anthrachinon-Gesamtkonzentration von 10 μ M bezogene AQ-HEG-5'-T-Anteil [%] 0; 10; 25; 50; 75; 90 und 99 Mol-% betrug;

Figur 9

die Fluoreszenz nach Hybridisierung einer Cy5-markierten 55mer-Oligonukleotid-Probe mit Polycycloolefin-immobilisiertem 18mer-Oligonukleotid, wobei zur Immobilisierung eine 10 μ M Lösung des Oligonukleotids 5-fach mit einem Kapillardispenser (Kapillarinne Durchmesser im Bereich von 1.5 - 5 μ M) in einem Raster von 50 μ m als Spot aufgetragen wurde;

Figur 10

eine Maske zur fotolithographischen Vorstrukturierung der Trägeroberfläche mit Aussparungen von 100 μ m Durchmesser in einem Raster von 400 μ m und Positioniermarken;

Figur 11

die Fluoreszenz nach Hybridisierung unterschiedlicher Konzentrationen einer Cy5-markierten 55mer-Oligonukleotid-Probe (10^{-11} ; 10^{-10} ; 10^{-9} ; 10^{-8} ;

- 10⁻⁷; 10⁻⁶; 10⁻⁵ M) mit Polycycloolefin-immobilisiertem 18mer-Oligonukleotid (200 µm-Spots), wobei die mit O gekennzeichneten Werte ohne Filter, die mit Δ gekennzeichneten Werte mit einem ersten Filter und die mit □ gekennzeichneten Werte mit einem zweiten Filter aufgenommen wurden;
- 5 **Figur 12** die Fluoreszenz nach Hybridisierung unterschiedlicher Konzentrationen einer Cy5-markierten 55mer-Oligonukleotid-Probe (2x10⁻¹³; 2x10⁻¹²; 2x10⁻¹¹; 2x10⁻¹⁰; 2x10⁻⁹ M;) mit Polycycloolefin-immobilisiertem 18mer-Oligonukleotid (10 µm Spots);
- 10 **Figur 13** die Fluoreszenz von Polycycloolefin-immobilisiertem, Cy5-markierten (B) und nicht-markierten (A) 18mer-Oligonukleotid vor Hybridisierung sowie die Chemilumineszenz nach Hybridisierung mit biotinylierter 18mer-Oligonukleotid-Probe und anschließender Inkubation mit Streptavidin-POD (B' bzw. A');
- 15 **Figur 14** eine schematische Explosionsdarstellung eines Dipsticks (A) und eines dazu passenden Behältnisses (B).

In den Figuren 2 bis 9 und 11 bis 13 ist die Fluoreszenz als Intensität in willkürlich gewählten Einheiten [AU] aufgetragen.

20 1 **Hintergrundfluoreszenz des Trägermaterials**

Die Hintergrundfluoreszenz verschiedener Trägermaterialien bei 635 nm-Anregung und 670 nm-Emission wurde mit einem hochauflösenden konfokalen Laserscanner untersucht (Fig. 1). Polycycloolefine, Polymethylpenten sowie Polystyrol auf Pyrexglas zeigen eine niedrigere Fluoreszenz als ein Standardobjektträger.

25

2 **Herstellung der Sonden**

a) Oligonukleotid (Biomolekül B)

Oligonukleotide wurden in an sich bekannter Weise über eine Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode hergestellt. Es wurden über das 3'-OH an die Festphase gekoppelte Oligonukleotide mit DMTr-geschütztem 5'-OH und folgender Sequenz synthetisiert:

- SEQ ID NO:1: 5'-AACAGCTATGACCATG-3'
- 35 SEQ ID NO:2: 5'-TATTCAGGCTGGGGGCTG-3'

SEQ ID NO:3: 5'-AGCTGGTGGCGTA-3'

SEQ ID NO:4: 5'-TGGTGACGTAGGC-3'

SEQ ID NO:5: 5'-GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG-3'

5 b) Chinon-Spacer-Konstrukt (Q-S)

Dieses wurde in an sich bekannter Weise aus Anthrachinon-2-carbonsäure, Mono-Boc-1,3-propandiamin und Hexaethylenglykol synthetisiert.

c) Chinon-Spacer-Oligonukleotid-Konstrukt (Q-S-B) bzw. Chinon-Spacer-T-Konstrukt

- 10 Nach dem Aufbau obiger Sequenzen, wurde abermals die DMTr-Schutzgruppe am 5'-Ende unter sauren Bedingungen mit ZnBr_2 entfernt und das freie 5'-OH mit dem 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropyl-chlorphosphoramidit-aktivierten Konstrukt Q-S umgesetzt.

In analoger Weise wurde ein Konstrukt aus Thymidin und dem Q-S-Konstrukt erhalten.

15

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der synthetisierten Chinonderivate:

Bezeichnung	Struktur
AQ-1	AQ-CO-NH-(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₂ -(OCH ₂ CH ₂) ₅ -O-PO ₂ -5'(SEQ ID NO:1)-3'
AQ-2	AQ-CO-NH-(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₂ -(OCH ₂ CH ₂) ₅ -O-PO ₂ -5'(SEQ ID NO:2)-3'
AQ-3	AQ-CO-NH-(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₂ -(OCH ₂ CH ₂) ₅ -O-PO ₂ -5'(SEQ ID NO:3)-3'
AQ-4	AQ-CO-NH-(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₂ -(OCH ₂ CH ₂) ₅ -O-PO ₂ -5'(SEQ ID NO:4)-3'
AQ-5 ¹⁾	AQ-CO-NH-(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₂ -(OCH ₂ CH ₂) ₅ -O-PO ₂ -5'T-3'
AQ-6 ²⁾	AQ-CO-NH-(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₂ -(OCH ₂ CH ₂) ₅ -O-PO ₂ -5'(SEQ ID NO:2)-3'
AQ-7 ³⁾	AQ-CO-NH-(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₂ -(OCH ₂ CH ₂) ₅ -O-PO ₂ -5'(SEQ ID NO:5)-3'

- 1) anstatt Oligonukleotid eine einzige Base T
 2) Cy5-markiert, zwischen HEG und Oligo
 20 3) PCR-Primer

3. Array-Herstellung

3.1 Arrays mit Kunststoffoberfläche

- 25 Sofern nicht ausdrücklich angegeben, wurde das unter dem Handelsnamen Zeonex®480R zum Anmeldezeitpunkt erhältliche Polycycloolefin verwendet.

3.1.1 Oligonukleotid-Arrays

3.1.1.1 Arrays mit Spots aus 16meren auf unterschiedlichen Oberflächenmaterialien

Wäßrige Lösungen (0,2M NaCl) von AQ-1 (0,05 μ M) wurden von Hand als 0,5 μ L Tropfen in 4-fach-Werten auf verschiedene Oberflächen (A-D) aufpipettiert (Pitch 2-4 mm): A: Polycycloolefin (Zeonex 480R; Zeon); B: Polystyrol auf Pyrexglas; C: Teflon auf Pyrexglas; D: CxHy auf Silicium. Nach dem Eintrocknen der Spots wurden die Träger 10 min mit UV-Licht (340 nm) bestrahlt und 3 x 5 min mit Bidest-Wasser gewaschen, um überschüssige Sonden zu entfernen.

10 3.1.1.2 Arrays mit verschiedenen Größen von Spots aus 18meren

Eine wässrige Lösung (2 mM Calciumchlorid; 1 Vol.-% 1-Propanol) von AQ-2 (10 μ M) wurden mit einem Piezodispenser (1-Kanal; Genesis NPS 100/4 mit Active Tip M, TECAN AG, Hombrechtikon, CH) in einem Raster von 500 μ m auf Polycycloolefin (Zeonex 480R; Zeon) aufgetragen. Die Tropfengröße betrug etwa 1,5 nL. Nach dem Eintrocknen der Spots wurde der Träger 1 min mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurde der Träger zunächst in eine wässrige Lösung mit 0.5 – 1% Tween 20 getaucht und kurz geschwenkt. Dann wurde gründlich mit 0.1%-iger Tween 20-Lösung gespült und der Träger 2 x 10 min in jeweils frische 0.5-1%-ige Tween 20-Lösung eingetaucht, dazu geschüttelt. Abschließend wurde der Träger unter Schütteln 10 min in 2-Propanol getaucht, mit Wasser abgespült und an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Die Durchmesser der resultierenden Spots betrugen etwa 150 bis 200 μ m. In entsprechender Weise konnten Spots mit einem Durchmesser von etwa 12 μ m erhalten werden, indem man mit einem Kapillardispenser Tropfengrößen von etwa 1 pL (Kapillarinne Durchmesser im Bereich von 1.5 - 5 μ m) in einem Raster von 50 μ m auftrug.

25

3.1.1.3 Array mit Spots aus 18meren in unterschiedlichen Mengen

5-fach Replikate der in 3.1.1.2 verwendeten Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,5; 1; 3; 5; 8; 10; 20 μ M) von AQ-2 wurden wie unter 3.1.1.2 beschrieben mit dem Piezodispenser bei einer Tropfengröße von 1,5 nL auf Polycycloolefin immobilisiert.

30 3.1.1.4 Arrays mit Spots aus 18meren in unterschiedlichen Dichten

In Anlehnung an die in Beispiel 3.1.1.2 beschriebene Vorgehensweise wurden Lösungen (2 mM Calciumchlorid; 1 Vol.-% 1-Propanol) auf mit dem Piezodispenser bei einer Tropfengröße von 1,5 nL Polycycloolefin aufgetragen, die zusätzlich zum AQ-2 das Anthrachinonderivat AQ-5 in unterschiedlichen Konzentrationen enthielten. Die aufzutra-

genden Lösungen wurden so eingestellt, daß die Anthrachinon-Konzentration von AQ-2 + AQ-5 stets 10 µM betrug.

3.1.1.5 Arrays mit Spots aus fluoreszenzmarkierten 18meren

In Anlehnung an die in Beispiel 3.1.1.2 beschriebene Vorgehensweise wurden Lösungen
 5 (2 mM Calciumchlorid; 1 Vol-% 1-Propanol), die einerseits AQ-2 (10 µM), andererseits AQ-6 (10µM) enthielten, in Triplikaten mit dem Piezodispenser bei einer Tropfengröße von 1,5 nL auf denselben Polycycloolefin-Träger aufgetragen.

3.1.1.6 Arrays mit 150 µm bzw. 200 µm Spots aus 13meren unter Verwendung eines Piezo- bzw. Druckpulsdispensors

10 Desweiteren wurden in Anlehnung an die in Beispiel 3.1.1.2 beschriebene Vorgehensweise wässrige Lösungen (2 mM Calciumchlorid; 1 Gew.-% 1-Propanol) von AQ-3 (10 µM) einerseits mit einem Piezodispenser (1-Kanal; Genesis NPS 100/4 mit Active Tip M, TECAN AG, Hombrechtikon, CH), andererseits mit einem Druckpulsdispenser (24-Kanal; TopSpot, HSG-IMIT, Villingen-Schwenningen) in einem Raster von 300 µm bzw. 500 µm
 15 auf Polycycloolefin gespottet. Die Tropfengröße betrug etwa 0.5 nl bzw. 1,5 nl.

3.1.2 **Array mit Spots aus PCR-Amplifikat**

DNA aus der Zelllinie Colo320 (k-ras-Wildtyp) wurde unter Verwendung der unten spezifizierten Primer RasUS1 und RasDS135 amplifiziert. Die Länge des PCR-Amplifikats
 20 betrug 157 bp. Ferner wurde ein entsprechendes Amplifikat unter Verwendung von RasDS135 und einem RasUS1 entsprechenden AQ-gekoppelten Primer (AQ-7) erzeugt.

Locus	Bezeichnung	Polarität	Sequenz 5' – 3'	SEQ D	5' Modif.
K-ras Exon1	RasUS1	Sense	GTACTGGTGGAGTATTTGA-TAGTG	NO:5	
	RasDS135	Antisense	ATCGTCAAGGCACTCTTGC-CTAC	NO:6	
	AQ-7	Sense	GTACTGGTGGAGTATTTGA-TAGTG	NO:5	AQ-HEG

PCR-Bedingungen pro Ansatz: 100 ng DNA, 1,5 mM MgCl₂; 100 µM dNTPs; 250 nM
 25 Primer; 1 U Taq-Polymerase (Qiagen; HotStar); 7,5 % Glycerol; in 50 µl 1 x PCR-Puffer.

Thermocycling: 1 x 95 °C 15 min; 35 x (94 °C 60 s, 70°C 50 s, 58 °C 50 s, 72 °C 60 s); 1 x 72 °C 7 min.

- Die PCR-Produkte mit und ohne AQ-Primer wurden 1:2 und 1:20 (nur AQ-Primer) mit
- 5 Spottinglösung (2mM CaCl₂, 1 Vol% 1-Propanol) verdünnt und je 1,5 nL in 5-fach Replikaten auf Polycycloolefin in Anlehnung an die in Beispiel 3.1.1.2 beschriebene Vorgehensweise immobilisiert.

3.2 Array mit Glasoberfläche

- 10 Glasobjektträger wurden über einen Sol-Gel-Prozeß mit Cyclohexyldichloromethylsilan (Fluka) vorbeschichtet. Dazu wurde das Silan mit Wasser vorhydrolysiert und das Gemisch mit verdünnter Salzsäure leicht angesäuert. Zuvor mit Isopropanol (10% Diethylether) und Ultraschall (15min) gereinigte Glasobjektträger (Menzl) wurden in das Hydrolysat eingetaucht und langsam wieder herausgezogen. Die Glaträger wurden bei
- 15 80-150°C getrocknet. Auf die resultierende Oberfläche wurden wäßrige Lösungen (2mM CaCl₂) von AQ-3 und AQ-4 (jeweils 10µM) mit einem Druckpulsdispensor (24-Kanal; TopSpot, HSG-IMIT, Villingen-Schwenningen) in 4-fach Replikaten bei einer Tropfen-größe von 1,5 nL in einem Raster von 500 µm auf demselben Polycycloolefin-Träger immobilisiert.

20 3.3 Arrays mit strukturierter Oberfläche

- Zunächst wird eine Chromschicht auf die Polycycloolefin- oder Glasoberfläche aufgesputtert. Bei der Verwendung von Titan wird dieses aufgedampft. Der anschließend aufgetragene Photolack (Resistsystem AZ 1512, Clariant) wird dann über die in Fig. 10 schematisch dargestellte Maske belichtet. Bei der Entwicklung werden die belichteten
- 25 Lackstellen entfernt. Zuletzt werden die so freigelegten Stellen der Metallschicht weggeätzt. Die ausgesparten Flächen haben einen Durchmesser von 100 µm und das Raster beträgt 400 µm. Die Spot-Durchmesser von jeweils 12 ausgesparten Flächen betragen für Polycycloolefin 102,07 µm und für Glas 100,74 µm mit Variationskoeffizienten von 0,033% bzw. 0,042%.

30

In Figur 14 ist schematisch eine Explosionsdarstellung eines Dipsticks (A) mit Verschlußmittel 1 und daran angefügtem Körper (2), der einen Array 3 aufweist, sowie eines Behältnisses 4 mit Probenfluid 5 gezeigt. Der Array 3 kann ein Array immobilisierter Biomoleküle mit oder ohne Vorstrukturierung sein.

35

4. Array-Qualitätskontrolle

Der Array aus Beispiel 3.1.1.5 wurde mit einem konfokalen Fluoreszenzscanner vermessen. Fig. 13 (linke Hälfte) zeigt den Scan. Immobilisiertes AQ-2 ist nicht zu erkennen (Bildausschnitt A) während immobilisiertes AQ-6 (Bildausschnitt B) ein Fluoreszenzsignal liefert, anhand dessen die Qualität der Spots beurteilt werden kann.

5. Array-Hybridisierung

5.1 16mer-Sonden

Die Chips (Oberflächenproben mit Array) werden für 1h bei RT in 20 mL einer 0,05 μ M Lösung einer 5'-Cy5-markierten 16mer-Probe (SEQ ID NO: 7: 5'-CATGGTCATAGCTGTT-3') in 5xSSC-T (Natriumchlorid/Natriumzitratspuffer mit 0,1% Tween 20) eingelegt. Danach wurde die überschüssige Probe mit 5xSSC-T abgespült und die Fluoreszenz gemessen.

5.2 18mer-Sonden

10 μ L einer in PerfectHyb (Sigma, Deisenhofen) gelösten 5'-Cy5-markierten 55mer-Probe SEQ ID NO:8 [5'-CTACGTTGCCCCCTGACCTGCAGCCCCCAGCCTGAATATGTGAACCAGCCAGAT-3'] wurde auf den Array pipettiert. Die Proben-Konzentration betrug 10^{-11} ; 10^{-10} ; 10^{-9} ; 10^{-8} ; 10^{-7} ; 10^{-6} ; 10^{-5} M bzw. 0,05 nM. Es wurde 1h bei RT inkubiert. Danach wurde die überschüssige Probe kurz mit 5 x SSPE abgespült und die Fluoreszenz gemessen.

5.3 Cy5-markierte 18mer-Sonden

20 μ L einer 5nM in 6xSSPE-T (=6xSSPE mit 0.1 Vol% Tween 20) gelösten, am 5'-Ende biotinylierten 18mer-Probe (SEQ ID NO:9: 5'-CAGCCCCCAGCCTGAATA-3') wurde auf den Array pipettiert. Nach einem Waschschrift mit 6xSSPE-T wurde mit Steptavidin-POD (Sigma; Verdünnung 1:100 in 6xSSPE-T) inkubiert (30 min, RT). Es wurde erneut mit 6xSSPE-T gewaschen. Es wurde 10 μ L Chemilumineszenzsubstrat (SuperSignal, ELISA, Pierce) zugegeben, 2s belichtet und die Chemilumineszenz bestimmt.

5.4 13mer-Sonden; PCR-Amplifikate

30 μ L einer in 6xSSPE mit 0.1% Tween 20 gelösten, Cy5-markierten 24mer-Probe (SEQ ID NO:10: 5'-CTTGCCTACGCCACCAGCTCCAAC-3') wurden auf den Array pipettiert. Die Proben-Konzentration betrug 5 nM. Es wurde 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die überschüssige Probe kurz mit 6xSSPE-T abgespült und die Fluoreszenz gemessen.

Unter Verwendung des in Figur 14 gezeigten Dipsticks geht man folgendermaßen vor. Das die Probe enthaltende Hybridisierungsgemisch wird in das Behältnis 4 vorgelegt. Der Dipstick wird in das Behältnis 4 eingeführt, so daß der Array 3 mit dem Hybridisierungsgemisch in Kontakt kommt. Das Behältnis 4 wird mit dem Verschußmittel 1 verschlossen. Erforderlichenfalls wird die Probe, z.B. ein PCR-Amplifikat, denaturiert, in der Regel mindestens 2 min bei 94°C. Dann kann auf 0 bis 4°C abgekühlt werden. Die anschließende Hybridisierung erfolgt wie üblich, z.B. bei 37°C 60 min. Anschließend entnimmt man den Dipstick, wäscht und wertet den Array aus.

6. Auswertung

Die Arrays wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzscanner (Fluoreszenz) oder mit einem Chemilumineszenz-Detektor (Chemilumineszenz) vermessen.

6.1 Unspezifische Bindung

Die Untersuchung der in Beispiel 3.1.1.1 hergestellten Arrays zeigt, daß Polycycloolefin sowie Polystyrol auf Pyrexglas aufgrund geringerer unspezifischer Bindung der Probe ein wesentlich besseres Verhältnis von Signal- zu Hintergrundfluoreszenz zeigen als CxHy auf Silizium und Teflon auf Pyrexglas, das bei diesen nachteiligen Trägermaterialien in einem Bereich unterhalb von 10 liegt (Fig. 2).

6.2 Spot-Homogenität

Zur Herstellung der Arrays aus Beispiel 3.1.1.3 wurden unterschiedliche Mengen an Sonden aufgetragen. Mit steigender Sonden-Konzentration nimmt die Homogenität der Spots zu (Fig.3) bis schließlich eine Sättigung der Oberfläche erreicht wird (Fig.4). Bei einer Sonden-Konzentration von 10 –20 µM werden sehr homogene Spots von etwa 150-200 µm Durchmesser erhalten (Fig. 5).

Auch die gemäß Beispiel 3.2 auf Glasoberflächen aufgetragenen Spots sind homogen. Es wird eine gute Diskriminierung zwischen Perfect Match und Mismatch erzielt (Fig. 6).

Fig. 7 zeigt, daß gute Immobilisierungsausbeuten auch für PCR-Amplifikate erzielt werden (vgl. Beispiel 3.1.2).

6.3 Sondendichte

Die Untersuchung eines gemäß Beispiel 3.1.1.4 hergestellten Arrays zeigt, daß die Menge an hybridisierter Probe und damit die Dichte an immobilisierter Sonde AQ-1 mit steigendem Anteil des nichthybridisierenden AQ-HEQ-5'-T (AQ-6) stetig abnimmt (Fig. 8).

- 5 Auf diese Art und Weise läßt sich die Oberflächendichte der immobilisierten Sonden reproduzierbar einstellen. Im Gegensatz zu einer einfachen Reduzierung der Sondenkonzentration bleibt die Homogenität der Spots bei der Verdünnung mit AQ-HEQ-5'-T erhalten.

6.4 Präzision

- 10 Die Meßdaten zu den mit dem 1-Kanal Piezodispenser gemäß Beispiel 3.1.1.6 aufgetragenen Spots sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1:

n = 64	Spot	VC [%]
Area	0.02 mm ²	5.0
Volume	167 000 AU	6.4
Diameter	153 µm	6.3

- 15 Der Variationskoeffizient (VC) über 64 Spots liegt für die Spotflächen (Area) bei Einzeltropfenabgabe (ca. 0.5 nL) bei 5%. Der Variationskoeffizient für die Spotvolumina (Volume) und die Spotdurchmesser (Diameter) liegt nach Hybridisierung unter 7%. Alle 64 Spots bildeten zusammen ein regelmäßiges Gitter (Array).
- 20 Die Meßdaten zu den mit dem 24-Kanal Druckpulsdispensor gemäß Beispiel 3.1.1.6 aufgetragenen Spots sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2:

n = 24	Spot	VC [%]
Area	80.2 pixel	5.58
Volume	571402 AU	6.80
Diameter	202 µm	2.78

- 25 Die Variationskoeffizienten für die Spotflächen liegen hier unter 6% und die integrierten Signale unter 7%.

Die Interassay-Varianzen für die Spotdurchmesser liegen bei der willkürlichen Auswahl von 4 Chips aus 400 nach Hybridisierung bei 7,0%.

- 5 Die Meßdaten zu den mit dem Kapillardispenser gemäß Beispiel 3.1.1.2 aufgetragenen Spots sind in Fig. 9 aufgetragen und in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3:

n = 20	Spot	VC [%]
Area	134 pixel	9.4
Volume	215.790 AU	10.9

- 10 Wie im Querschnitt zu sehen ist, sind auch die ca. 12 µm breiten Spots sehr gleichmäßig. Die Intraassay-Varianz (n = 20) für die Spotflächen liegt unter 10% und die Intraassay-Varianz für die Volumina beträgt lediglich 11%.

6.5 Dynamischer Hybridisierungsbereich

- Aus Figur 11 ist ersichtlich, daß der dynamische Bereich der gemäß Beispiel 3.1.1.2 erhaltenen 200 µm Spots größer ist als der dynamische Meßbereich des verwendeten konfokalen Fluoreszenzscanners. Es mußten daher im oberen Konzentrationsbereich Abschwächungsfilter in den Strahlengang eingebracht werden. Der dynamische Hybridisierungsbereich für die 200 µm Spots beträgt $>10^5$. Für die gemäß Beispiel 3.1.1.2 erhaltenen 10 µm Spots wird ein dynamischer Bereich von $>10^4$ bei einer um eine
- 20 Größenordnung niedrigeren Nachweisgrenze erreicht (Fig. 12).

[Patentansprüche]

1. Array immobilisierter Biomoleküle, die an eine kohlenstoffhaltige Trägeroberfläche gekoppelt sind, dadurch gekennzeichnet, daß die kohlenstoffhaltige Oberfläche wenigstens ein Polymer auf Cycloolefin-Basis enthält oder erhältlich ist dadurch, daß man eine Glas-, Metall- oder Keramikoberfläche mit einer wässrigen Lösung wenigstens einer hydrolysierbaren kohlenstoffhaltigen Verbindung behandelt und die Oberfläche trocknet.
2. Array nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Biomoleküle über wenigstens ein Chinon, vorzugsweise ein Anthrachinon gekoppelt sind.
3. Array nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplungsgruppe und das Biomolekül über einen Spacer verknüpft sind.
4. Array nach Anspruch nach 3, dadurch gekennzeichnet, daß das der Spacer markiert ist.
5. Array nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymer auf Norbornen-Struktureinheiten basiert.
6. Array nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrolysierbare kohlenstoffhaltige Verbindung ein Silan der Formel XVIa



20

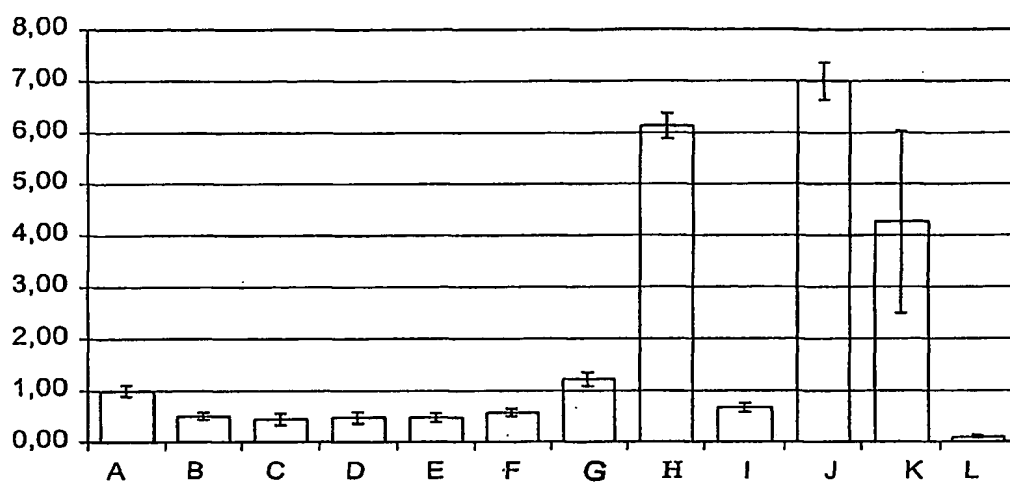
ist, wobei die Reste R^{16} unabhängig voneinander für Halogen, C_1 - C_4 -Alkoxy oder C_1 - C_4 -Acyloxy stehen, die Reste R^{17} unabhängig voneinander für C_1 - C_{30} -Alkyl oder C_3 - C_{10} -Cycloalkyl stehen und z einem Wert von 1, 2 oder 3 entspricht.

7. Array nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Teile der Oberfläche eine Metallschicht, vorzugsweise eine Chrom- oder Platinschicht, aufweisen.
8. Träger mit kohlenstoffhaltiger Oberfläche zur Immobilisierung von Biomolekülen über Kopplungsgruppen, dadurch gekennzeichnet, daß Teile der Oberfläche einen Überzug aufweisen, an den die Kopplungsgruppen nicht koppeln.
9. Vorrichtung auf Basis wenigstens eines Arrays nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in Form eines Chips oder Dipsticks.
10. Vorrichtung auf Basis wenigstens eines Trägers nach Anspruch 8 in Form eines Chips oder Dipsticks.
11. Dipstick nach Anspruch 9 oder 10, umfassend ein Verschlußmittel 1 und einen daran angefügten Körper 2, der wenigstens einen Array 3 aufweist.
12. Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen, wobei man wenigstens ein Derivat einer Kopplungsgruppe auf einen Träger mit kohlenstoffhaltiger Oberfläche aufbringt.

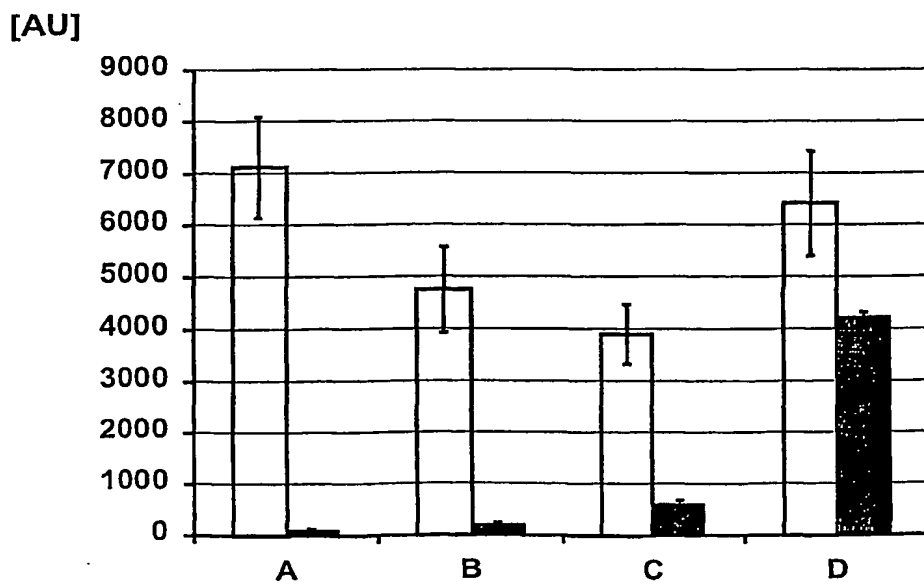
- tiger Oberfläche aufbringt,
belichtet und
erforderlichenfalls die immobilisierten Derivate in die Biomoleküle überführt,
dadurch gekennzeichnet, daß man als kohlenstoffhaltige Oberfläche wenigstens ein
5 Polycycloolefin verwendet.
13. Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen, wobei man
eine Trägeroberfläche mit wenigstens einer hydrolysierbaren kohlenstoffhaltigen
Verbindung behandelt,
wenigstens ein Derivat einer Kopplungsgruppe auf die kohlenstoffhaltige Trä-
10 geroberfläche aufbringt;
belichtet und
erforderlichenfalls die immobilisierten Derivate in die Biomoleküle überführt,
dadurch gekennzeichnet, daß man eine wässrige Lösung der hydrolysierbaren
kohlenstoffhaltigen Verbindung verwendet.
- 15 14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß man Chinonde-
rivats verwendet.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man
die Derivate der Kopplungsgruppen und ein hygroskopisches Salz, vorzugsweise
Calciumchlorid, aufbringt.
- 20 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß man
Teile der Oberfläche so behandelt, daß die Derivate der Kopplungsgruppen an die
behandelte Oberfläche im wesentlichen nicht koppeln.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man auf die Oberfläche
eine Metallschicht aufbringt und Teile dieser Schicht wieder entfernt.
- 25 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man
nach Belichtung mit einem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch wäscht, das 0,1
bis 10, vorzugsweise 0,5 bis 2 und insbesondere 1 Gew.-% eines Tensids enthält.
19. Verwendung eines Arrays nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder einer Vorrichtung
nach Anspruch 9 oder 11 für diagnostisch/analytische Zwecke.

1/9

Figur 1



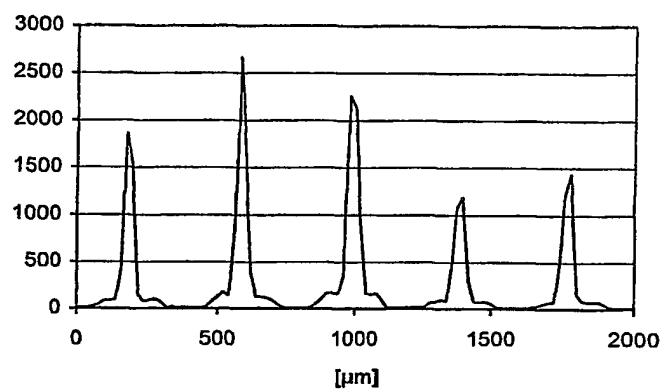
Figur 2



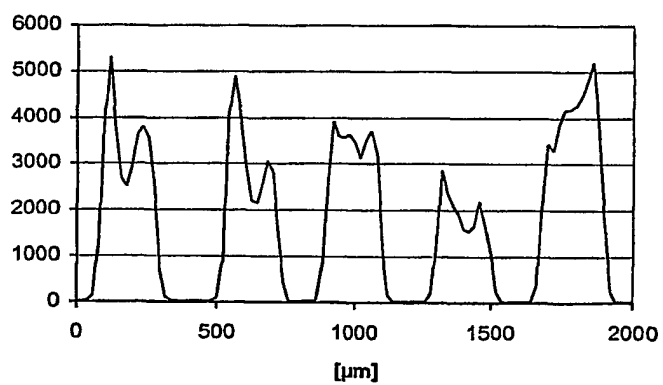
2/9

Figur 3

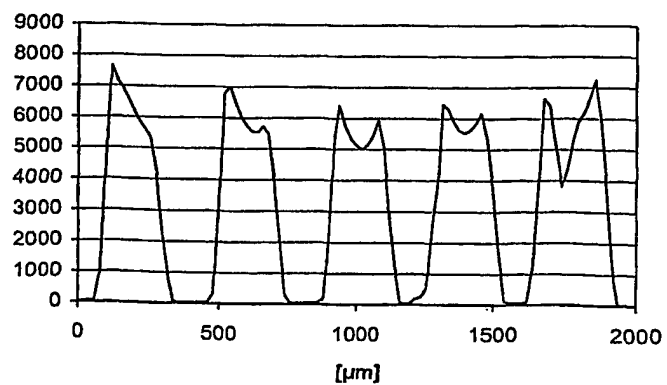
A



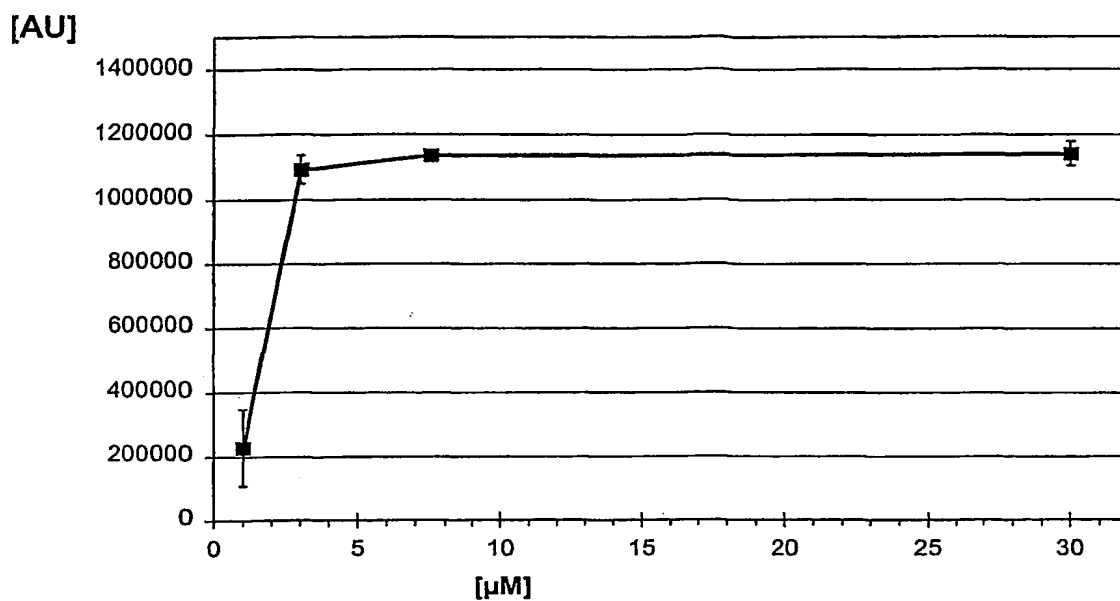
B



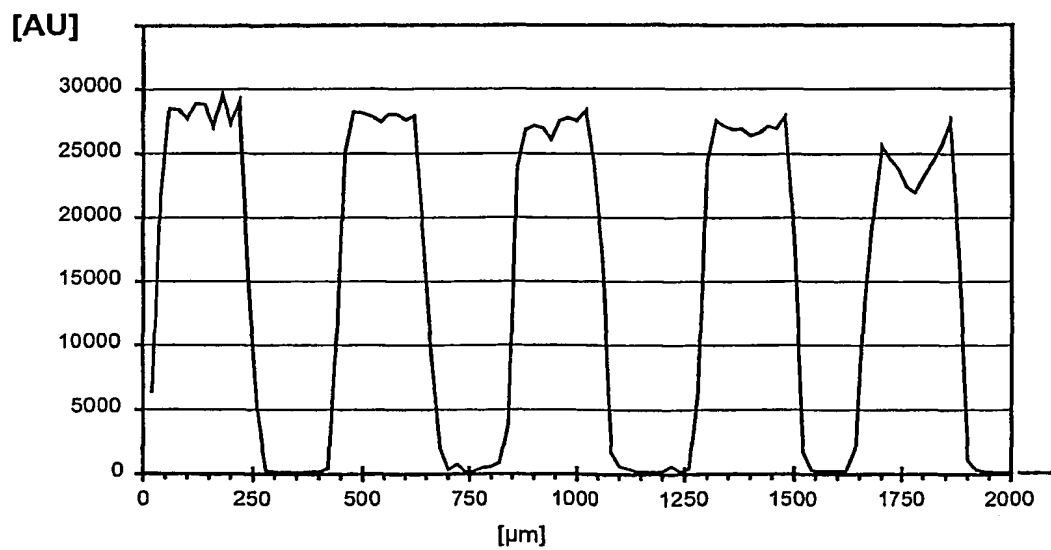
C



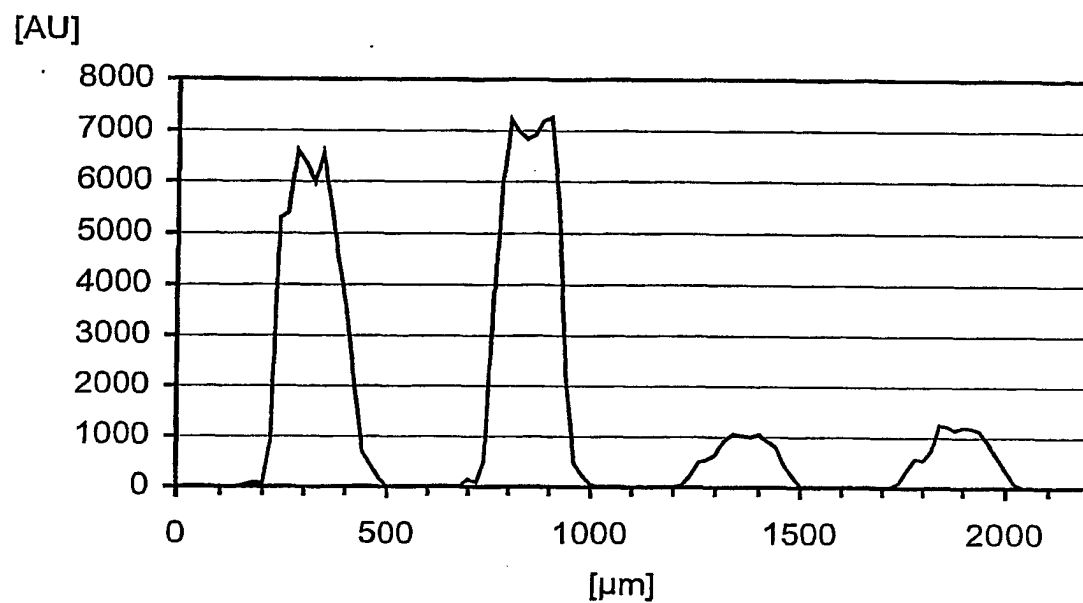
Figur 4



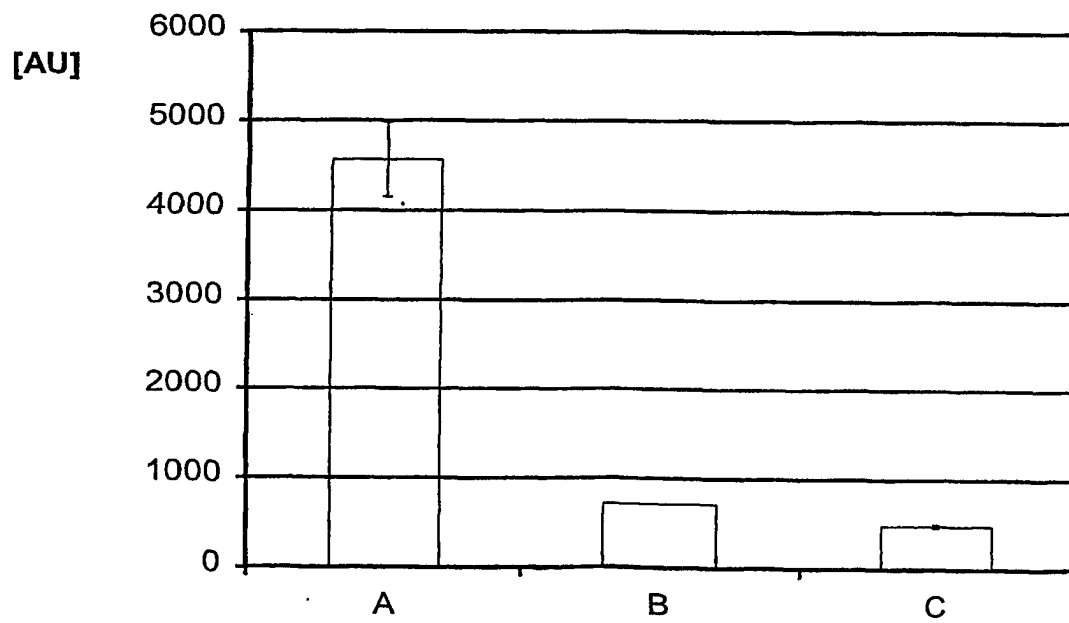
Figur 5



Figur 6

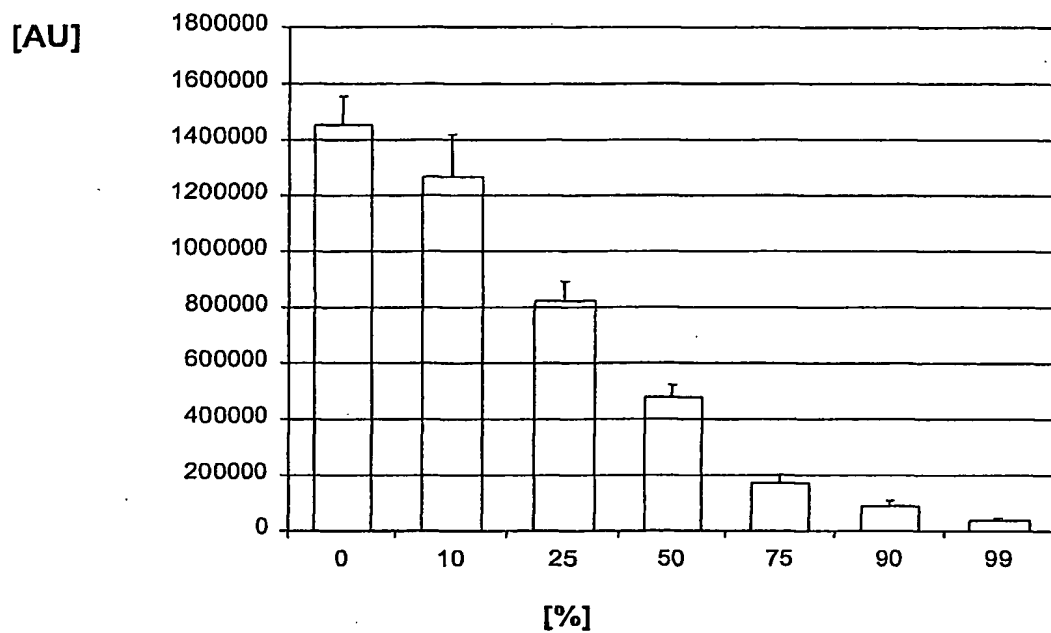


Figur 7

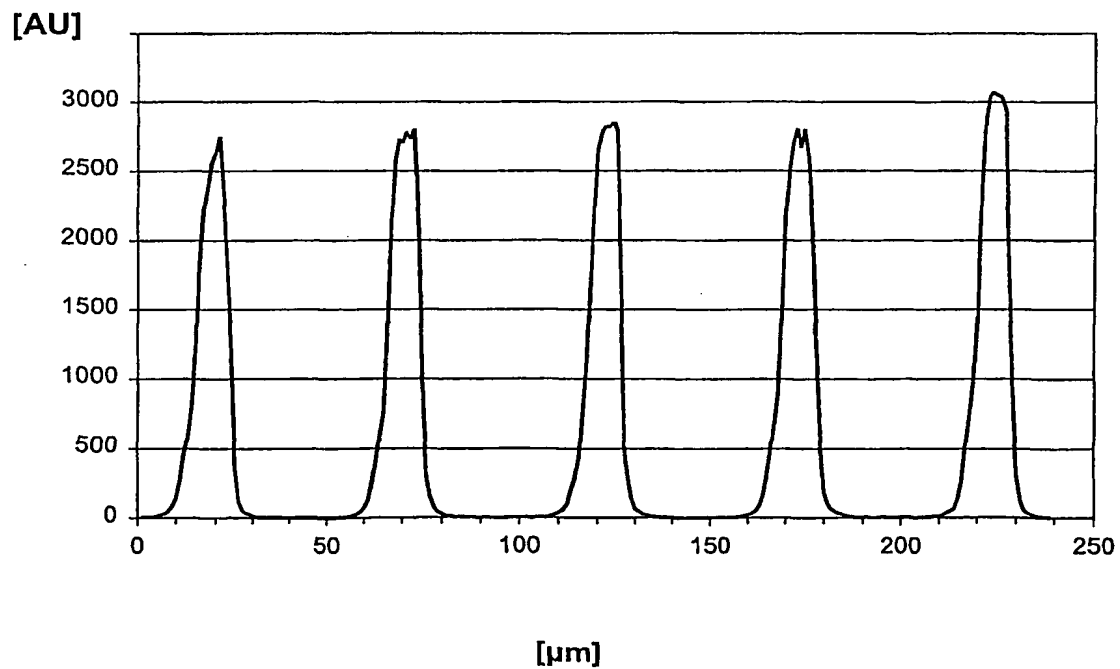


5/9

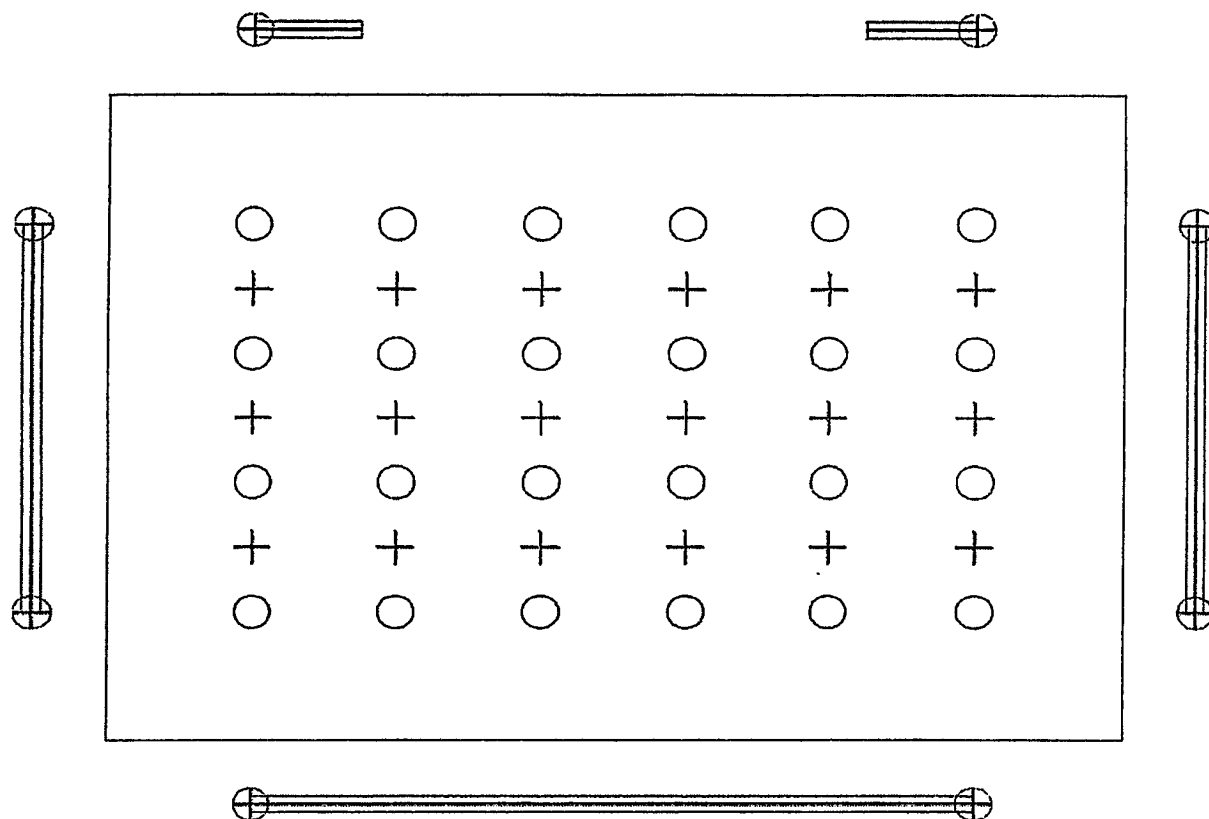
Figur 8



Figur 9



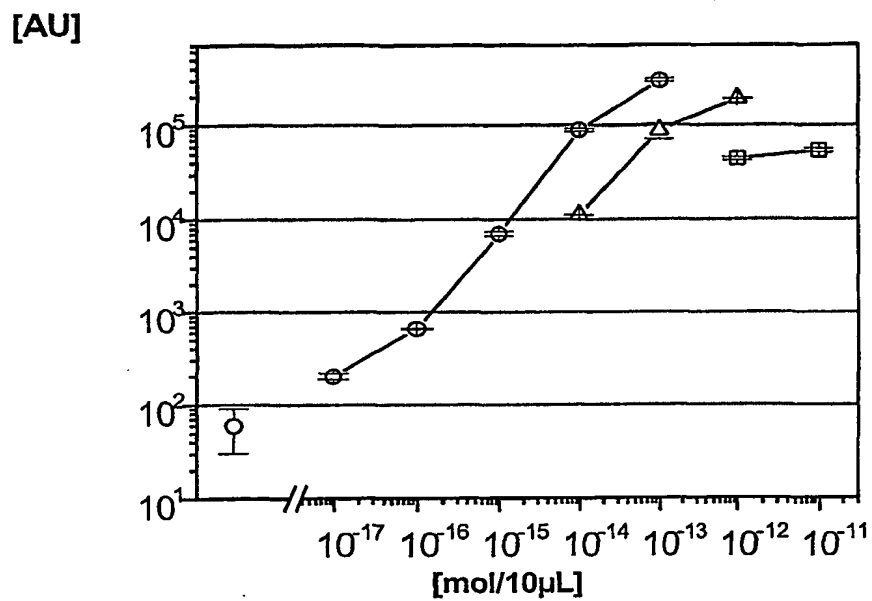
Figur 10



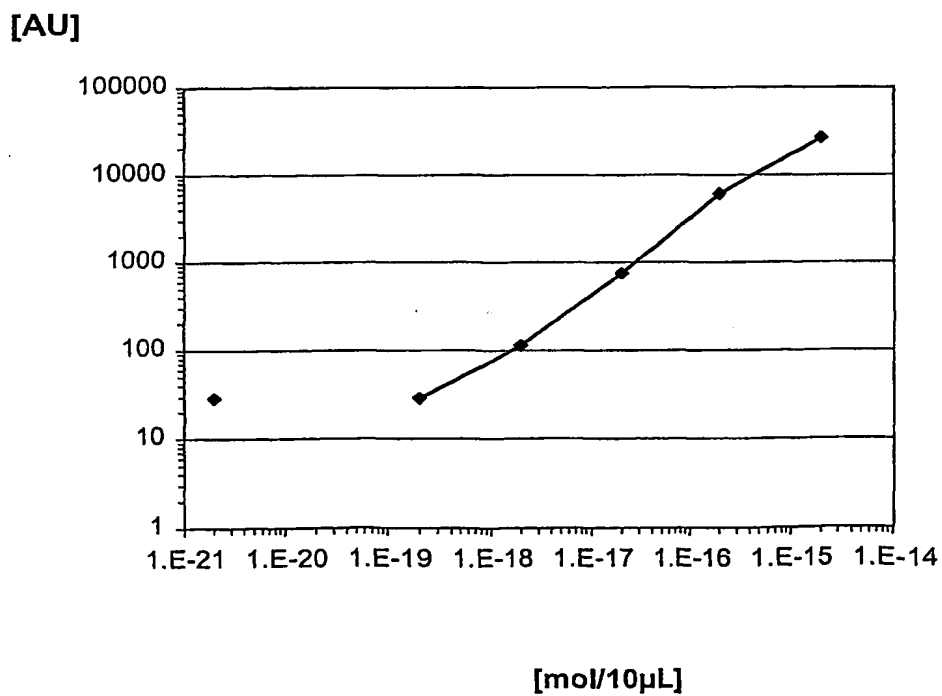
Spot Array Layout (M 50:1)

7/9

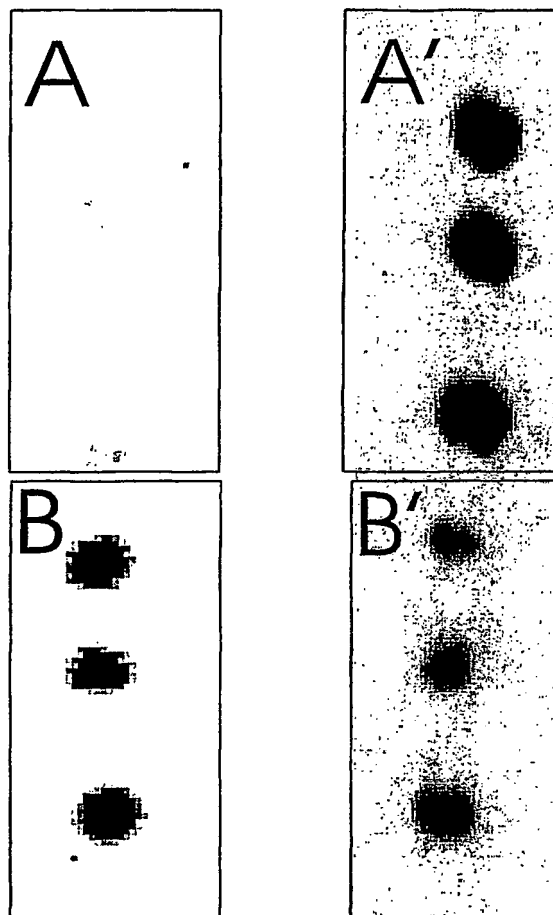
Figur 11



Figur 12

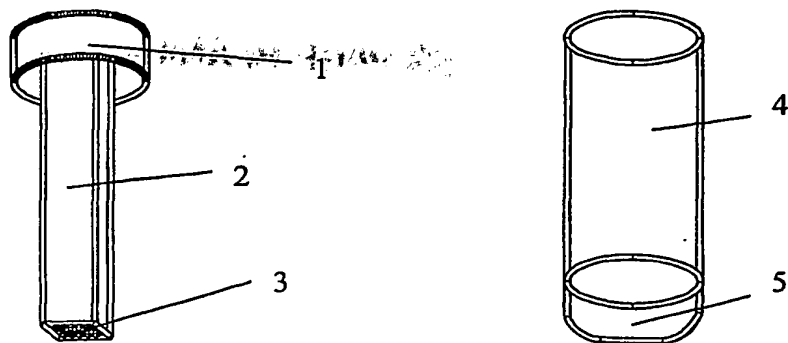


Figur 13



BEST AVAILABLE COPY

Figur 14



THIS PAGE BLANK (USPTO)